EINFLUSS VON PROTEASEN AUF DAS TRANSPORTVERHALTEN VON BÜRSTENSAUMMEMBRANVESIKELN DES DÜNNDARMES UND DES PROXIMALEN TUBULUS DER NIERE VON RATTEN

ROSEMARIE ROHN

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0018

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main
Direktor der Abteilung Physiologie: Prof.Dr.K.-J.Ullrich

Einfluß von Proteasen auf das Transportverhalten von Bürstensaummembranvesikeln des Dünndarmes und des proximalen Tubulus der Niere von Ratten

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

vorgelegt von
Rosemarie Rohn
aus Bad Homburg v.d.H.

Frankfurt/Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H.J.Müller

Referent: Prof. Dr. med. K.-J.Ullrich

1. Korreferent: Prof. Dr. med. W.Groß

2. Korreferent: Prof. Dr. med. W.Schoeppe

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Mai 1983

Meinen Eltern zum Dank

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGEN..... 1

EINLEITUNG..... 2

METHODEN

1. Präparation der Bürstensaummembranvesikel

a. Membranisolierung Jejunum..... 9

b. Membranisolierung proximaler Tubulus der Niere..... 10

2. Proteolyse

a. Proteolytische Behandlung der Bürstensaummembran-
vesikel..... 12

b. Hemmung der Proteasenwirkung..... 13

3. Charakterisierung der Membranvesikel

a. Proteinbestimmung..... 14

b. SDS-Elektrophorese..... 15

c. Enzymbestimmungen..... 17

4. Transportstudien

a. Versuchsaufbau..... 19

b. Hemmung des Glukose- und Alanintransports..... 21

c. Phosphat-Transport..... 21

d. Berechnung..... 22

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

METHODEN

5. Elektronen-Mikroskopie

a. Dünnschnittmethode..... 23

b. Negativkontrastmethode..... 23

c. Gefrierbruchmethode..... 23

ERGEBNISSE

1. Enzymatische Charakterisierung der Membran..... 25

2. Einfluß der Proteasen auf Enzymaktivitäten..... 26

3. SDS - Elektrophorese..... 30

4. Einfluß der Proteasen auf den Na^+- abhängigen Glukosetransport in Bürstensaummembranvesikel..... 34

5. Einfluß der Proteasen auf den Na^+- abhängigen Alanintransport in Bürstensaummembranvesikel..... 36

6. Hemmt $HgCl_2$ den Alanintransport oder zerstört es die Membranvesikel..... 38

7. Papaineinfluß auf den Na^+- abhängigen Phosphattransport in Bürstensaummembranvesikel..... 40

8. Elektronenmikroskopische Darstellung der proteolytisch behandelten Bürstensaummembranvesikel..... 42

DISKUSSION..... 45

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ZUSAMMENFASSUNG..... 52

TABELLEN UND ABBILDUNGEN..... 54

LITERATURVERZEICHNIS..... 84

ABKÜRZUNGEN

BSMV:	Bürstensaummembranvesikel
LAP:	Leucinaminopeptidase
AP:	Alkalische Phosphatase
GGT:	γ-Glutamyltranspeptidase
MAL:	Maltase
SUC:	Saccharase
TRE:	Trehalase
TRIS:	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
HEPES:	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
SDS:	Dodecylsulfat-Na-Salz
TLCK:	N-α-p-Tosyl-L-Lysine-chloromethyl-Keton
EM:	Elektronen-Mikroskopie
MG:	Molekulargewicht
A:	Aktinbande
I:	Isomaltase
TCA:	Trichloressigsäure

EINLEITUNG

Durch das Epithel des Dünndarmes und des proximalen Tubulus der Niere können eine Reihe von Stoffen aktiv transportiert werden. Beim aktiven Transport unterscheidet man zwischen primär aktiv und sekundär aktiv. Primär aktiv verläuft ein Transport, wenn dieser Transportvorgang direkt durch eine energieliefernde chemische Reaktion unterhalten wird. Zum Beispiel werden Natriumionen primär aktiv aus der Zelle durch die basolaterale Membran des Dünndarmes und des proximalen Tubulus der Niere heraustransportiert. Dieser Transport wird durch die Na^+- K^+- ATPase getätigt, wobei ATP energieliefernd es Substrat ist. Durch die Pumpwirkung der Na^+- K^+- ATPase wird die intrazelluläre Natriumkonzentration herabgesetzt. Es entsteht dadurch ein Konzentrationsgefälle für Natriumionen, entlang dessen Natriumionen aus dem Lumen des Darmes oder proximalen Tubulus durch die Bürstensaummembran in die Zelle hineinfließen. Im Kotransport können die Natriumionen Zucker, Aminosäuren, Phosphat und andere Stoffe mit in die Zelle nehmen. Die Natriumionen dienen sozusagen als energieliferndes Kosubstrat, das ein bestimmtes Substrat auch gegen dessen Konzentrationsgefälle in die Zelle transportiert. Man spricht dann von einem Flußkopplungsmechanismus im Zusammenhang mit der Na^+- K^+- ATPase, die den Na^+- Gradienten aufbaut oder von sekundär aktivem Transport. Der Nachweis, daß es sich bei der Aufnahme von Zuckern und Aminosäuren um einen Fluß-

kopplungsmechanismus handelt, konnte zum einen mit elektrophysiologischen Methoden und zum anderen anhand von Versuchen mit isolierten Bürstensaummembranvesikeln erbracht werden. (1).

Bei den elektrophysiologischen Versuchen ging man von der Vorstellung aus, daß zum Beispiel Glukose durch einen Natrium-Substrat-Flußkopplungsmechanismus vom Lumen in die Zelle gebracht wird, daß also bei einem luminalen Glukoseangebot ein Na^+-Ionenstrom vom Lumen in die Zelle stattfindet. Dieser Na^+-Ionenstrom muß zu einer Änderung der elektrischen Potentialdifferenz über die Bürstensaummembran führen, welche mit Mikroelektroden intrazellulär gemessen werden kann. Bei Zugabe von Glukose zum luminalen Perfusat kam es in der Tat zu plötzlichen Potentialänderungen. Da intrazellulär gegenüber dem Extrazellulärraum ein elektronegatives Potential herrscht, kommt es durch den Glukose-gekoppelten Kationenstrom durch die luminale Zellmembran zu einem Absinken der negativen Potentialdifferenz, d.h. zu einer Zelldepolarisation. Es sinkt auch gleichzeitig der elektrische Widerstand der luminalen Zellmembran. Auch die L-Aminosäuren werden mit einem positiven, natriumabhängigen Ionenstrom in die Zelle transportiert. Bei der Aufnahme von anorganischem Phosphat in die Zelle kommt es nur bei niedrigem pH zu einer Zelldepolarisation. Phosphat liegt dabei in Form von $H_2PO_4^-$ vor, und es kommt bei Transport zusammen mit zwei Na^+- Ionen insgesamt zu einem Transport von einer positiven Überschußladung. Liegt Phosphat bei höherem

pH - Wert in Form von $H_2PO_4^{2-}$ vor, kommt es zu einem elektroneutralen Fluß (2).

Ein weiterer Beweis für den Flußkopplungsmechanismus von Natriumionen und verschiedenen Substraten konnte durch Versuche an isolierten Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) erbracht werden. Wenn es ein Natrium-Substrat-Kotransportsystem gibt, so muß man nicht nur eine Stimulation der Substrataufnahme durch Na^+- Ionen sehen, sondern auch eine Stimulation der Na^+- Aufnahme durch das Substrat zeigen können. Dies konnte für D-Glukose, verschiedene Aminosäuren sowie für anorganisches Phosphat gezeigt werden (3).

Für die Absorption von Stoffen aus dem Dünndarmlumen und der Reabsorption von Primärharnbestandteilen aus den proximalen Tubuli der Niere gibt es in den Bürstensaummembranen von Dünndarm und proximalen Tubulus weitgehend identische Transportmechanismen. In der vorliegenden Arbeit soll nun auf den ausführlich beschriebenen Transporteigenschaften isolierter Bürstensaummembranvesikel aufbauend, das Einwirken von Proteasen auf die Transportsysteme, insbesondere das Natrium-Substrat-Kotransportsystem für D- Glukose, L- Alanin und anorganisches Phosphat untersucht werden. Als Proteasen wurden Trypsin und Papain gewählt. Aufschlußreiche Ergebnisse über die Proteaselabilität der Bürstensaummembran des Duodenums, Jejunums und Ileums beim Menschen wurden bereits 1975 von

D. Maestracci gewonnen. Er konnte zeigen, daß bei Verdauung der intestinalen Bürstensaummembran durch Trypsin kaum eine Beeinflussung der hydrolytischen Enzymaktivitäten auftritt mit Ausnahme der Leucinaminopeptidase (LAP). Dagegen konnte er bei Papainbehandlung eine starke Verminderung der Maltase (MAL), Saccharase (SUC), Lactase und LAP-Enzymaktivitäten erreichen. Auch vom Gesamtprotein der Bürstensaummembran konnte er durch Papain 50% freisetzen. Gleichzeitig mit dem Verlust der Enzymaktivitäten durch Papainbehandlung konnte elektronenmikroskopisch ein Verlust der Partikelstruktur auf der Membranoberfläche gezeigt werden. Daraus wurde geschlossen, daß die hydrolytischen Enzyme als Partikel vorliegen,und daß die Enzyme SUC, MAL, Lactase und LAP im Unterschied zu Alkalischer Phosphatase (AP) und Trehalase (TRE) eher an die Oberfläche der Membran gebunden als in die Membran integriert sind (4).

Welches Ausmaß die Proteolyse an der Bürstensaummembran erreicht hat, soll in unseren Arbeiten mit Vesikeln vom proximalen Tubulus der Niere und vom Dünndarm der Ratte vor allem anhand der Abnahme von membrangebundenen Enzymaktivitäten verfolgt werden. Ausgewählt wurden dazu Markerenzyme der Bürstensaummembran, die Alkalische Phosphatase (AP), Leucinaminopeptidase (LAP), γ - Glutamyltranspeptidase (GGT),Maltase (MAL), Trehalase (TRE) und Saccharase (SUC). Als weiteres Kriterium für das Ausmaß der Proteolyse versuchten wir die

proteolytisch behandelten Bürstensaummembranbestandteile mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufzutrennen. Dabei stellte sich folgendes methodisches Problem. Die proteolytisch behandelten BSMV, die für Transportversuche und Enzymmessungen verwandt wurden, und die BSMV, die mit Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können nicht in allen Schritten gleich behandelt werden. Daher ist auch eine Interpretation der Gele in Korrelation zu den Transportergebnissen und Enzymaktivitäten nur mit Vorbehalt möglich. Die für die Elektrophorese verwandten Vesikel sind im Gegensatz zu den anderen Vesikeln nach der proteolytischen Behandlung mit SDS versetzt und erhitzt worden. Durch Zugabe von SDS sind die Vesikel geöffnet worden und falls die Protease nicht vollständig von der Membran weggewaschen worden war, hatte die Protease die Möglichkeit, an Bindungen anzugreifen, die ihr vorher aus räumlichen Gründen nicht zugänglich waren. Diese Gefahr ist bei der Behandlung mit Papain in ausgeprägterem Maße vorhanden, da Papain bis zu einer Tempearatur von über 60°C aktiviert wird und daher beim Denaturieren der Membran bei der Vorbereitung zur Elektrophorese enorm aktiviert wird. Somit erhält man in der Elektrophorese eventuell eine Darstellung weiter abgedauter Membranen, als sie für die Transportversuche und Enzymmessungen verwandt wurden.

Ob durch die proteolytische Behandlung der vesikuläre Raum zerstört wurde, könnte aufgrund von elektronenmikroskopischen

Bildern und den Gleichgewichtswerten der Substrataufnahme bei den Transportversuchen geklärt werden.

Die vorliegende Arbeit verfolgt hauptsächlich drei Ziele:

a) Bestimmung der Proteaselabilität von Transportmechanismen.
Es wurde untersucht, ob es möglich ist, durch Proteolyse ein am Transportprozeß beteiligtes Protein abzudauen und so den Substrattransport zu hemmen. Da es in der Bürstensaummembran eine Reihe von Transportsystemen gibt, ist es auch interessant, ob es eine unterschiedliche Reaktion der Transportsysteme auf die Proteolyse gibt. Untersucht wurde das Transportverhalten von α - D- Glukose, L- Alanin und anorganischem Phosphat. Für diese Substrate werden jeweils unterschiedliche Transportsysteme in der Bürstensaummembran angenommen.

b) Gibt es mögliche Beziehungen zwischen Transportaktivität und Enzymaktivität ?
Dabei wird besonderes Augenmerk auf die γ-Glutamyltranspeptidase und deren mögliche Rolle im Aminosäuretransport geworfen. In der Arbeit von Orlowski und Meister (5) wurde die These aufgestellt, daß Glutathion eine Carrierfunktion im Aminosäuretransport spielt und die Enzyme des γ - Glutamyl-Cyclus am Transportprozeß mitbeteiligt sind. Die GGT soll sich dabei mit der zu transportierenden Aminosäure und dem Carrier verbinden. Über die Rolle der AP beim Phosphattransport ist man

geteilter Meinung. Einige Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität der AP und der Transportrate von Phosphat im proximalen Tubulus (6,7). Andere Autoren halten einen Zusammenhang zwischen Phosphattransport und AP für unwahrscheinlich (8,9).

c) Vergleiche im Abdauverhalten zweier ähnlicher Membranen

Die Bürstensaummembran des Dünndarms und des proximalen Tubulus der Niere ähneln sich im Transportverhalten von Substraten. Es wurde nun untersucht, ob sich die Bürstensaummembranen der verschiedenen Organe auch bei Proteolyse identisch verhalten. Als Kriterium dienten dazu die Hydrolasen und Transportsysteme. Ein Vergleich membrangebundener Enzymaktivitäten bzw. Transportfunktionen mit dem Proteinmuster, das für eine bestimmte Membranbehandlung durch Elektrophorese erhalten wurde, konnte aus methodischen Gründen nicht durchgeführt werden.

METHODEN

1. Präparation der Bürstensaummembranvesikel (BSMV)

Die Bürstensaummembranvesikel wurden von Jejunum und Nieren männlicher Albinoratten vom Stamm "Wistar W 64" der Firma Winkelmann, Kirchborchen gewonnen. Die Tiere bekamen Altromin-Standarddiät und Leitungswasser und wogen 160 - 200 g.

1 a. Membranisolierung Jejunum

15-20 Tiere wurden durch Genickschlag getötet, die Jejuna sofort mit der Schere unversehrt herausgeschnitten und in eiskalte Ringerlösung gelegt. Sämtliche Präparationsschritte wurden dann, wie in Tabelle 1 angegeben, bei 0 - 4°C durchgeführt. Mit Ringerlösung wurde der Darm gespült und so vom Darminhalt gesäubert. Danach wurde er mit Hilfe eines dünnen Stabes umgestülpt und die Mukosa mit einem Objektträger von der Darminnenseite abgeschabt. Die Mukosa wurde in 60 ml eiskalten Puffer - 300 mM Mannitol/12 mM Tris-HCl pH 7,1 - gegeben, im Verhältnis 1:5 mit eiskaltem bidestillierten Wasser verdünnt und 3 Minuten im Braun-Mixer (Hersteller Braun AG, Frankfurt/M. Typ MX32) auf Stufe 3 homogenisiert. Vom Homogenat wurde eine geringe Menge zur Enzymbestimmung abgenommen,

bevor man $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM/l dazugab. Nach 15 Minuten wurde bei 7700 g für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 140 ml 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris - Puffer pH 7,4 gelöst und mit einem Teflonpestill in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator 10 mal bei 1000 rpm resuspendiert. Dann wurde erneut $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM/l zugegeben und 15 Minuten gewartet und die Suspension bei 7700 g für 15 Minuten und davon der Überstand bei 20400 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun wieder verworfen, das Sediment mit 2 ml des letzten Puffers durch eine Spritze mindestens 6 mal homogenisiert und nochmals 5 Minuten bei 1900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, auf das benötigte Volumen mit dem letzten Puffer verdünnt und zu gleichen Teilen in zwei Gläschen verteilt, um in ihnen die proteolytische Behandlung anzuschließen. Sämtliche Zentrifugationen wurden mit einer gekühlten Sorvall RC 2B Zentrifuge und Rotor Sorvall Type SS 34 durchgeführt. Die einzelnen Präparationsschritte sind in Tabelle 1 nochmals übersichtlich zusammengefaßt.

1 b. Membranisolierung proximaler Tubulus der Niere

10-15 Tiere wurden durch Genickschlag getötet, die Nieren sofort entnommen und in eiskalten 10 mM Mannitol - 2 mM Tris-

HCl pH 7,1 - Puffer gelegt. Sämtliche Präparationsschritte wurden dann bei 0 - 4°C durchgeführt. Zunächst wurden die Nieren dekapsuliert, die Nierenrinde hauchdünn mit einem Rasiermesser abgetragen und 1:10 mit obigem Puffer verdünnt. Mit einem ESGE - Zauberstab M100 (Hersteller ESGE AG, Elektrogerätefabrik CH - 9501 Mettlen/Schweiz) wurde die Nierenrinde 5 Minuten homogenisiert und eine geringe Probe zur Enzymbestimmung abgenommen. Das Homogenat wurde mit $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM/l versetzt, nach 15 Minuten wurde das Homogenat nochmals 1:1 mit obigem Puffer plus $CaCl_2$ verdünnt und bei 120 g 12 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei 15000 g 12 Minuten zentrifugiert. Nachdem dieser Überstand verworfen wurde, wurde das Sediment in der Hälfte der ursprünglichen Menge Puffer in 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes-Tris pH 7,4 aufgenommen und mit einem Teflonpestill in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator 10 mal bei 1000 rpm homogenisiert. Dann wurde erneut $CaCl_2$ in 10 mM/l Endkonzentration hinzugegeben und die Suspension nach 15 Minuten wie zuvor 1:1 verdünnt und bei 1900 g 12 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde 20 Minuten bei 30000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder verworfen und das Sediment mit 1,5 ml des letzten Puffers durch eine Spritze mindestens 6 mal homogenisiert und nochmals 5 Minuten bei 1900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, auf das benötigte Volumen mit dem letzten Puffer verdünnt und zu gleichen Teilen in zwei Gläschen verteilt, die wiederum zur

proteolytischen Behandlung verwandt wurden. Auch diese Zentrifugationen wurden alle mit einer gekühlten Sorvall RC 2B Zentrifuge und Rotor Sorvall Type SS 34 durchgeführt. Übersichtsmäßig sind die Präparationsschritte der Nierenmembran in Tabelle 2 wiedergegeben.

2. Proteolyse

2 a. Proteolytische Behandlung der Bürstensaummembranvesikel

Die Behandlung der BSMV mit proteolytischen Enzymen wurde in Anlehnung an die Methode von D. Maestracci (4) durchgeführt. Als Proteasen wurden verwendet:
Papain aus Papaya carica Art. 108014 von Boehringer,Mannheim,
Trypsin aus Rinderpankreas Art. 109827 von Boehringer, Mannh.
Die BSMV, die zu gleichen Teilen in zwei Gläschen verteilt wurden, enthielten in unseren Versuchen 2-4 mg Protein und wurden 5 Minuten bei 25°C in einem Schüttelwasserbad Nr. 3047 (von Fa. Fischer, Frankfurt) mit einer Schüttelfrequenz von 120/min vorinkubiert. Einem Glas wurde zur Zeit 0 eine Protease, dem anderen als Kontrolle dasselbe Volumen an Puffer bei 25°C und Schüttelfrequenz 120/min. zugesetzt. Dann wurde mit beiden Gläsern gleich verfahren. Nach gegebener Zeit wurde die Reaktion gestoppt, indem 1 ml Probe entnommen und diese in eiskaltem Puffer - 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris pH 7,4 -

1:20 verdünnt wurde. Die BSMV wurden durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 48500 g sedimentiert. Um noch lösliche Protease herauszuwaschen, wurde das Sediment erneut in 1 ml Puffer - 100 mM Mannitol- 20mM Hepes Tris pH 7,4 - verdünnt und 30 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge Mikro-Rapid (Fa. Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in der für das Experiment benötigten Menge Puffer gelöst. Ein Teil der BSMV wurde sofort für Transportstudien und elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet. Der Rest wurde für Enzym- und Proteinbestimmungen bei -20°C eingefroren. 2-4 mg Bürstensaumprotein wurden mit jeweils 70 µg Papain oder 1,4 mg Trypsin inkubiert. Papain wurde zuvor bei 37°C mit 100 mM KCN im Verhältnis 1:1,5 aktiviert. Für jede mit Proteasen behandelte Membran wurde eine unbehandelte Kontrollmembran hergestellt, die in sämtlichen Schritten wie die abgedaute Membran behandelt wurde.

2 b. Hemmung der Proteasenwirkung

Da die Transportmessungen zu den Hydrolasenaktivitäten in Beziehung gesetzt werden, diese aber erst nach Einfrieren bei -20°C gemessen wurden, mußte sichergestellt sein, daß die Abdaureaktion durch Verdünnung 1:20 in eiskaltem Puffer auch wirklich gestoppt wurde. Dazu wurden Dünndarmvesikel mit Papain inkubiert und Proben nach 30 Sekunden, 5 Minuten

und 1 Stunde Inkubationszeit 1:20 in eiskaltem Puffer verdünnt, um die proteolytische Reaktion zu stoppen. Dann wurden die Membranen 30 Minuten bei 48500 g sedimentiert, erneut in 1 ml Puffer gelöst und durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Nachdem das Pellet wieder in Puffer aufgenommen war, wurde jeweils die Hälfte einer Probe tiefgefroren. Die andere Hälfte wurde zuerst 1:5 verdünnt und 30 Min. bei 25°C inkubiert, um die Möglichkeit der weiteren Abdauung zu provozieren, und danach erst tiefgefroren. Dann wurden die Enzymaktivitäten aller Proben bestimmt. Sollte durch die Verdünnung die proteolytische Aktivität von Papain gestoppt sein, so müßten die zeitgleichen Proben mit und ohne weitere Inkubation bei 25°C dieselben Werte aufweisen. (Siehe dazu Tabelle 3)

3. Charakterisierung der Membranvesikel

3 a. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde zu Beginn im Gesamthomogenat und nach Abdauung in der BSMV-Fraktion bestimmt. Das Protein wurde mit 10 %iger Trichloressigsäure ausgefällt und in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Fa. Hettich, Tuttlingen Mikro-Rapid max. 13000 U/min.) herunterzentrifugiert. Mit 1 N Natronlauge wurde das Sediment resuspendiert und der Proteingehalt nach der

Methode von Lowry (10) mit kristallinem Rinderserumalbumin als Standard gemessen.

3 b. SDS - Elektrophorese

Wie bereits erwähnt können wir nicht mit Sicherheit sagen, daß die in den Transportstudien und für die Enzymessung verwandten Vesikel genau so weit abgedaut sind, wie sie sich bei der Elektrophorese darstellen. Um zu verhindern, daß durch SDS-Zugabe und Erhitzen der Vesikel die eventuell noch in Spuren verbliebene Protease eine neue Chance hat, durch SDS-Zugabe neu exponierte Proteine abzudauen, wird die Proteolyse nicht nur durch Verdünnung in eiskaltem Puffer, sondern auch speziell durch Zugabe des Inhibitors TLCK (N-α-p-Tosyl-L-Lysine-chloromethyl-keton) gestoppt. Die mit Trypsin und Papain behandelten BSMV und im Vergleich dazu die unbehandelten Vesikel wurden durch Plattengele nach der Methode von Laemmli (11) aufgetrennt. Für die Gelelektrophorese wurden Trenngele mit der Ausmesseung 14 x 10 x 0,2 cm und 8,4 %igem Acrylamid- sowie 2,7 %igem Bisacrylamid-Gehalt gewählt. Die einzelnen Proben auf dem Sammelgel wurden im gleichen Volumen aufgetragen, enthielten aber nicht völlig gleiche Proteinmengen. Bei der Präparation der BSMV für die Elektrophorese wurden die Vesiekl ebenfalls mit einem Proteingehalt von 2-4 mg/ml hergestellt und mit der gleichen Proteasekonzentra-

tion wie bei Transportversuchen behandelt. Es wurden 0,5 ml der Membransuspension mit 0,5 ml einer Lösung mit Trypsin 1,4 mg/ml in 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris pH 7,4, bzw. mit 0,5 ml einer Lösung mit Papain 70 µg/ml in 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris pH 7,4 - 40 mM KCN, welches für 10 Minuten bei 37°C voraktiviert wurde, versetzt und während 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Dann wurden 100 µl TLCK in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und weitere 15 Min. inkubiert (TLCK wurde von Sigma, München Prod.Nr. T 7254 bezogen). Diese Membransuspension wurde in 35 ml eiskaltem Puffer (100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris pH 7,4) im Verhältnis 1:36 verdünnt, 60 Minuten bei 48500 g sedimentiert und nochmals in 35 ml des obigen Puffers resuspendiert und 60 Min. bei 48500 g zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in kleinem Volumen des Puffers 100 mM Mannitol-20 mM Hepes Tris pH 7,4 - 1 mM TLCK aufgenommen. Für die Denaturierung wurde zu der Membransuspension SDS in einer Endkonzentration von 2 % gegeben und 2 Minuten bei 95°C erhitzt. Generell, also auch bei den Vesikeln, die zu Enzymversuchen und Transportversuchen verwendet wurden, konnte an eine Hemmung der Proteasewirkung durch Zugabe von TLCK nicht gedacht werden, weil der Inhibitor die Membran so stark angreift, daß Transportstudien nicht mehr möglich waren. Wie die Kontrollversuche (Tabelle 3) zeigen, riskiert man bei geschlossenen Vesikeln und bei 25°C keine "Nachverdauung" der "proteasefrei" gewaschenen Vesikel durch unvollständig ausgewaschene Protease und kann daher auf den

Inhibitor TLCK auch verzichten.

3 c. Enzymbestimmungen

Es wurde der Einfluß der Proteasen auf die Enzymaktivitäten von Maltase (MAL), Saccharase (SUC), Trehalase (TRE), Alkalischer Phosphatase (AP), Leucinaminopeptidase (LAP) und γ-Glutamyltranspeptidase (GGT) - sämtlich Leitenzyme der Bürstensaummembran - untersucht.

Die zuckerspaltenden Enzyme wurden in Anlehnung an die Methode von Sacktor et al (12) und Bergmeyer (13) bestimmt. Als Substanzen wurden verwendet:
Maltose Art. 5912 von Merck
Hexokinase Art.Nr. 127817 von Boehringer, Mannheim
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase Art.Nr. 165833, Boehringer
Saccharose reinst Art. 7653 von Merck
α(+)-Trehalose Nr. 36770 von Serva

Die Messung der MAL beruht auf dem Prinzip der Glukosefreisetzung bei Zugabe von Maltose. Die Substratlösung zur Maltase-Messung enthielt:
250 mM Maltose, 2 mM NADP, 2 mM ATP, 10 µg/ml Hexokinase,
10 µg/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und
80 mM Imidazol - 24 mM $MgSO_4$ - Puffer (pH 6,7 mit HCl).

Diese Substratlösung wurde mindestens 30 Minuten bei 37°c inkubiert, um eventuell noch vorhandene freie Glukose zu eliminieren. Als Pufferlösung wurde angesetzt:
1 mM NADP, 1mM ATP, 10 µg/ml Hexokinase,
10 µg/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und
100mM Imidazol - 30 mM $MgSO_4$ - Puffer (pH 6,7 mit HCl).

Zu 1000 µl Pufferlösung wurden 50 µl Membransuspension gegeben, und dies in einen LKB Autoanalysator (Ultrolab System 8600 Reaction Rate Analyzer) gestellt, der 100 µl Substratlösung zuspritzte. Das gebildete $NADPH^+$ wurde bei 334 nm und 37°C photometrisch gemessen.

Die Saccharase und Trehalase wurden ebenso wie die Maltase gemessen. In die Substratlösung kam statt Maltose entweder 250 mM Saccharose oder 250 mM Trehalose.

Die Leucinaminopeptidase (LAP) wurde mit Merckotest^R Leucin-Arylamidase Art. 3359, Merck im LKB Autoanalysator bei 37°C und 410 nm Wellenlänge gemessen. Zu 1 ml Pufferlösung wurde 50 µl Membran gegeben. Von der Substratlösung L-Leucin-4-nitroanilid wurden 100 µl eingespritzt.

Die Alkalische Phosphatase (AP) wurde mit Merckotest^R Alkalische Phosphatase Art. 3344, Merck im LKB Autoanalysator bei 37°C und 410 nm Wellenlänge gemessen. Auf 1 ml Pufferlösung

kamen 20 µl Membran. Von der Substratlösung (3 Tabletten p-Nitrophenylphosphat in 9 ml Puffer gelöst) wurden 100 µl eingespritzt.

Die γ-Glutamyltranspeptidase (GGT) wurde mit Reagenzien von Sigma Chemical Company bestimmt. Als Substrat wurde GGTP Substrate Stock No. 415-20 (14 µmol L-γ-Glutamyl-p-Nitroanilide - 120 µmol Glycylglycine) und als Puffer AMPD-buffersolution Stock No. 415-8 (0,2 mol/l 2-Amino-2 Methyl- 1,3-Propanediol pH 8,6) verwendet. Das Substrat wurde nach Vorschrift (Sigma Technical Bulletin No. 415 Revised 1/77, Reissued 5/78) in 61 ml Puffer gelöst.Die Bestimmung wurde mit Hilfe des LKB Autoanalysators bei 37°C und 410 nm Wellenlänge durchgeführt. Zu 600 µl Pufferlösung kamen 50 µl Membranen. Von der Substratlösung wurden 250 µl eingespritzt.

4. Transportstudien

4 a. Versuchsaufbau

Die Transportstudien wurden nach der Millipore-Filtrationstechnik (14) durchgeführt, wobei die Membranvesikel sowohl mit Glukose als auch gleichzeitig mit Alanin markiert waren. 20 µl Bürstensaummembranfraktion wurde zu 80 µl Inkubationsmedium gegeben und unverzüglich 5 sec mit einem Rüttler der

Fa. Heidolph gemischt. Das Inkubationsmedium enthielt in der Regel 100 mM Mannitol - 20 mM Hepes Tris pH 7,4 - 100 mM NaSCN bzw. KSCN - 0,1 mM ^{14}C-markierte α-D-Glukose und 1 mM ^{3}H-markiertes L-Alanin. Die Radioaktivität pro 80 µl Inkubationsmedium betrug für ^{14}C-Glukose 8 µCi und für ^{3}H-Alanin 24 µCi, dies entsprach 2 µCi ^{14}C-Glukose/Zeitpunkt und 6 µCi ^{3}H-Alanin/Zeitpunkt, an dem die Substrataufnahme gestoppt wurde. Die Substrataufnahme wurde nach 20 Sekunden, 1 Minute und zweimal nach einer Stunde gestoppt, indem 20 µl des Inkubationsansatzes in 1 ml eiskalte Stoplösung gegeben wurden (50-fache Verdünnung) und dies sofort auf einem Membranfilter, Porengröße 0,6 µm (Fa. Sartorius, Göttingen Nr. 11305) aufgetragen wurde. Die BSMV wurden noch mit weiteren 5 ml Stoplösung auf dem Filter gewaschen. Die Stoplösung enthielt 100mM Mannitol, 100 mM Cholinchlorid, 20 mM Hepes Tris pH 7,4, 25 mM $MgSO_4$ und 0,2 mM Phlorizin. Da nach einer Stunde Inkubationszeit die Substrataufnahme von Glukose und Alanin einen Gleichgewichtswert erreicht, auf den man sich mit der Initialaufnahme beziehen kann, wurden nach einer Stunde zwei Proben genommen, aus denen der Gleichgewichtswert gemittelt wurde. Die getrockneten Filter mit der gewaschenen BSM-Fraktion wurden in 10 ml Scintillationsflüssigkeit "Rotiszint 33" (Fa. Roth, Karlsruhe) gelöst. Gezählt wurde die Radioaktivität in einem Liquidszintillations-Spektrometer (Searle Nuclear Chicago Division, Mark II).

4 b. Hemmung des Glukose- und Alanintransports

Um den Glukosetransport zu hemmen, wurde in das Inkubationsmedium mit NaSCN zusätzlich Phlorizin in einer Endkonzentration von 0,2 mM bezogen auf das Inkubationsmedium plus Bürstensaummembranfraktion gegeben. Phlorizin war in 50 %igem Äthanol gelöst, die Endkonzentration des Äthanols betrug im Versuchsansatz 2%. Um den Alanintransport zu hemmen wurde in das Inkubationsmedium mit NaSCN zusätzlich Quecksilberchlorid in einer Endkonzentration von 0,5 mM bezogen auf das Inkubationsmedium plus Bürstensaummembranfraktion gegeben. Quecksilberchlorid war in 50 %igem Äthanol gelöst. Die Endkonzentration des Äthanols betrug im Versuchsansatz ebenfalls 2 %.

4 c. Phosphat - Transport

Für die Transportstudien mit anorganischem Phosphat enthielt das Inkubationsmedium 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris pH 7,4, 100 mM NaSCN bzw. KSCN, 0,1 mM ^{3}H-markierte α-D-Glukose und 1,7 mM ^{33}P-markiertes Phosphat. Die Radioaktivität pro 80 µl Inkubationsmedium betrug für ^{3}H-Glukose 12 µCi und für ^{33}P-Phosphat 6 µCi d.h. 3 µCi ^{3}H-Glukose/Zeitpunkt und 1,5 µCi ^{33}P-Posphat/Zeitpunkt. Die radioaktiven Substanzen wurden von New England Nuclear, Boston, USA geliefert: ^{14}C-Glukose NEC-042x, ^{3}H-L-Alanin NET-348, ^{3}H-Glukose NET-050, ^{33}P- Mono-

potassium Phosphat Carrier 500mCi/mMol. Als Substrat für die Transportstudien wurde α-D-Glukose Art. 22700, Serva und L-Alanin A 7627, Sigma verwendet. Für die Stoplösung wurde Phlorizin Dihydrat Art. 4196 von der Fa. Roth benutzt.

4 d. Berechnung

Zur Berechnung der Substrataufnahme in die BSMV wurden die Counts Radioaktivität auf den Filtern um den Leerwert des Liquidszintillations-Spektrometers und den Spillover des ^{14}C und ^{33}P in den Tritium-Kanal korrigiert. Der Spillover von ^{3}H in den ^{14}C-Kanal bzw. ^{33}P-Kanal wurde vernachlässigt. Errechnet wurden die pMol Substrat/Filter. In dieser Versuchsreihe wurde nicht wie üblich die transportierte Menge Substrat pro mg Protein angegeben, weil der Proteingehalt durch die Abdauung mit Proteasen kein Kriterium mehr für das Volumen an Bürstensaummembran ist. Da die behandelte und unbehandelte Membran aus einer Präparation stammen und in allen Schritten gleich behandelt wurden, kann man jedoch davon ausgehen, daß pro Filter die gleiche Menge Bürstensaummembran aufgetragen wurde, die beiden Werte also direkt vergleichbar sind.

5. Elektronenmikroskopie

5 a. Dünnschnittmethode

Bei der Einbettung wurden die BSMV in 2,5 %igem Glutardialdehyd (pH 7,4 mit O,1 M Natriumkakodylat-HCl Puffer) fixiert. Das Glutardialdehyd wurde ausgewaschen und erneut mit 1 %igem Osmiumtetroxid fixiert. Das Osmiumtetroxid wurde ebenfalls ausgewaschen und die BSMV über Nacht bei $4^{o}C$ in 2 %igem Uranylazetat inkubiert, über eine Alkoholreihe entwässert und in Spurr`s Kunstharz eingebettet. (15,16)

5 b. Negativkontrastmethode

Bei der Negativkontrastierung wurde ein Tropfen Membransuspension auf einem mit Formvar befilmten Kupfernetz aufgebracht, das Salz mit Wasser herausgewaschen und anschließend mit 2,5 %igem Ammoniumolybdat (pH 5) kontrastiert.

5 c. Gefrierbruchmethode

Bei der Gefrierbruchätzung wurden die BSMV in 2,5 %igem Glutaraldehyd (pH 7,4 mit O,1 M Natriumkakodylat) fixiert und bis zu 30% mit Glyzerin als Gefrierschutzmittel ver-

setzt. In einem Gefrierbruchapparat (Bioetch 2005 Leybold Heraeus, Köln) wurde das Präparat gebrochen und mit einem Platin-Kohle-Gemisch bedampft. Der Abdruck wurde mit Chromschwefelsäure vom biologischen Material gereinigt und in einem EM 300 (Fa. Philips) untersucht.

ERGEBNISSE

1. Enzymatische Charakterisierung der Membran

Als Leitenzyme für die Bürstensaummembran wurden in unseren Versuchen die Alkalische Phosphatase, γ-Glutamyltranspeptidase, Leucinaminopeptidase, Maltase, Trehalase und Saccharase bestimmt. An ihnen wurde zunächst die Reinheit der Vesikelpräparation kontrolliert. Tabelle 4 gibt die Enzymaktivitäten in Darm- und Nieren- Gesamthomogenat, in der Vesikelfraktion und die Anreicherung der Enzyme in der Vesikelfraktion wieder. Die geringe Anreicherung der Trehalase ist dadurch zu erklären, daß die Enzymaktivität teilweise durch das Tieffrieren bei -20°C verloren geht. Außerdem diente uns der Aktivitätsverlust dieser Enzyme während der Proteasebehandlung als Kriterium für das Ausmaß der Abdauung. Den Grad unserer Proteinabdauung versuchten wir auch durch die direkte Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry festzustellen. Der Proteinverlust nach einer Stunde Abdauzeit mit 70 µg Papain beträgt nur 5 % für die Darmvesikel und 10 % für die Nierenvesikel. Nach einer Stunde Abdauzeit mit 1,4 mg Trypsin sind 12 % des Darmproteins und 13 % des Nierenproteins abgedaut worden. Nach diesen Werten ist durch die Proteolyse nur eine ganz minimale Abdauung zu erreichen. Wie wir später sehen werden, gehen jedoch die Enzymaktivitäten durch diese Proteasebehandlung

weitgehend verloren. Eine mögliche Erklärung für die in Tabelle 5 gezeigten Befunde ist ein Zurückbleiben hydrolysierter Proteinbruchstücke in der Membran sowie eine Absorption von Proteasen an die Membran selbst, so daß keine wesentliche Änderung des Lowry-positiven Proteins entsteht.

2. Einfluß der Proteasen auf Enzymaktivitäten

Zu einer Bürstensaummembranvesikelsuspension, die 2-4 mg Protein/ml enthielt, wurden 70 µg/ml aktiviertes Papain gegeben und die Reaktion nach 5 Minuten und einer Stunde gestoppt. Die Abbildung 1 zeigt die durch Papain innerhalb einer Stunde verursachten Aktivitätsänderungen verschiedener membrangebundener Enzyme. Die Anfangsaktivitäten der Enzyme, die an unbehandelten BSMV bestimmt wurden, sind auf 100 % gesetzt worden. Es zeigt sich, daß die Enzyme von Darm und Niere durch Papain nicht gleichermaßen angegriffen werden. Während sich die LAP und MAL von Darm und Niere ähnlich verhalten, nämlich durch Abdauung mit Papain in ihrer Enzymaktivität gemindert werden, verhalten sich die AP, GGT und TRE von Darm und Niere unterschiedlich. In der Niere geht die Aktivität der AP nicht zurück, die der GGT wurde hingegen um 36 % und die der TRE völlig gehemmt. Im Darm bleibt die Aktivität der TRE und GGT erhalten, während die der AP um 88 % vermindert wurde. Die SUC wurde am Darm bestimmt und verliert

um 80 % Aktivität. Abbildung 2 zeigt analog dazu die Aktivitätsminderungen innerhalb einer Stunde bei Inkubation mit 1,4 mg Trypsin auf 2-4 mg Protein. Auch hier wurden die Anfangsaktivitäten der Enzyme, die durch unbehandelte BSMV bestimmt wurden, auf 100 % gesetzt. Trypsin greift die Enzyme in Darm und Niere ähnlich an, jedoch wird die LAP in der Niere stärker gehemmt als im Darm.

Zusammenfassend ist in Abbildung 3 nochmals die Verminderung der enzymatischen Aktivität an Darm und Niere für die verschiedenen Proteasen nach einer Stunde Abdauzeit wiedergegeben. Die Säulen geben an, wieviel % der Enzymaktivität im Vergleich zu unbehandelten Membranen nach einer Stunde Abdauzeit noch vorhanden ist. Papain führt wie die Abb. 1 schon zeigte zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der untersuchten Enzyme in Darm und Niere. Trypsin hemmt die LAP in der Niere stärker. Trotzdem kann man sagen, daß Trypsin die Hydrolasen nicht so stark beeinflußt wie Papain. Am Darm ist durch keine der untersuchten Proteasen die Aktivität der GGT wesentlich beeinflußt worden. Während an der Niere keine der untersuchten Proteasen die Aktivität der AP beeinflussen konnte. Die Darmenzyme werden nicht so stark abgedaut wie die Nierenenzyme. Da die Inkubation der BSMV mit Proteasen nicht exakt pro mg BSM-Protein berechnet wurde, könnte man auf den ersten Blick annehmen, daß die stärkere Abdauung der Nierenmembran auf eine höhere Konzentration der Proteasen pro mg BSM-Protein

zurückzuführen ist. Es handelt sich hier aber um Mittelwerte aus mehreren Versuchen, bei denen einmal in der Niere, einmal im Darm etwas mehr Protein zugegen war. Gegen obigen Einwand spricht auch, daß Papain am Darm die AP abdaut, die GGT unbeeinflußt läßt und umgekehrt an der Niere die GGT abdaut und die AP unbeeinflußt läßt. Es handelt sich demnach nicht um ein Konzentrationsproblem, sondern um unterschiedliche Konstitution der GGT und AP in Darm und Niere. Dies ist eventuell durch unterschiedliche Lokalisation der einzelnen Enzyme in der Bürstensaummembran oder auch durch verschiedenartige Schutzfaktoren zu erklären. Für die Schutzfaktoren spricht, daß am Darm von Papain die MAL stärker angegriffen wird als die LAP, daß Trypsin umgekehrt mehr LAP als MAL abdaut. Dies kann nichts mit der Lokalisation zu tun haben.

Der Enzymaktivitätsverlust der BSM-Hydrolasen nach 1 Stunde proteolytischer Behandlung ist in Tabelle 6 nochmals in Prozenten mit Standardabweichung angegeben. Diese Tabelle gibt den Verlust an Enzymaktivität in Vesikeln wieder, mit denen die Transportstudien durchgeführt wurden. Tabelle 3 zeigt, daß es während der Inkubationszeit für die Transportstudien nicht zu einem weiteren Abdauen der Enzymaktivitäten gekommen ist, daß also die Proteasenhemmung durch Verdünnung erfolgreich war. Hier wird gezeigt, daß auch nach einer nochmaligen Inkubationszeit bei 25°C die Abdaukurven der Enzyme mit und ohne Inkubation identisch verlaufen.

Um vor allem die GGT, die am Darm weder vom Papain noch vom Trypsin signifikant abgedaut werden konnte, noch beeinflussen zu können, wurden die Proteasenkonzentrationen zur Abdauung nochmals um das 20-fache gesteigert. Der Enzymaktivitätsverlust nach dieser gesteigerten proteolytischen Behandlung ist zum Vergleich ebenfalls in Tabelle 6 jeweils in Klammern aufgeführt. Mit der gesteigerten Konzentration konnte durch Papainbehandlung (1,6 mg/ml und 2-3 mg BSM-Protein/ml) die Enzymaktivität der GGT am Darm, die mit der geringeren Papainkonzentration nicht angegriffen wurde, um 55 % gemindert werden. Auch die Enzymaktivitäten der AP, LAP, MAL und SUC wurden um mindestens 95 % gemindert. An der Niere führte die erhöhte Papainkonzentration besonders bei der GGT nochmals zu einer Steigerung des Verlusts an Aktivität von 37 % auf 95 %. Trypsinbehandlung, welche an der Niere nur die Aktivität der LAP um 95 % minderte, führte bei Erhöhung der Konzentration (20 mg/ml) zur Hemmung der AP um 17 %, der GGT um 60 % und der MAL um 93%. Auch am Darm wurde bei Trypsinkonzentration von 28 mg/ml die AP um 39 %, die GGT um 91 % und MAL von vorher 9% um 56 % gemindert. Die LAP verlor von 27% um 71 % an Aktivität.

3. SDS - Elektrophorese

Die mit Proteasen für 1 Stunde abgedauten und mit TLCK inkubierten Membranproteine wurden ebenso wie die der entsprechenden Kontrollmembranen durch Plattengel-Elektrophorese dargestellt um zu zeigen, wie stark die einzelnen Proteinbanden von den Proteasen angegriffen wurden (Abb. 4 und 5). Zudem konnte in einem weiteren Versuch gezeigt werden, daß sich die in der Einleitung geäußerte Vermutung, daß nach Zugabe von SDS die Proteasen und zwar insbesondere das Papain noch weiter abdauen, bewahrheitete. Dabei wurde die Proteolyse teils mit und teils ohne den Inhibitor TLCK gestoppt. Wir sehen dabei, daß alleiniges Wegwaschen durch Verdünnung die Proteolyse nicht stoppt. Ohne Inhibitor erhält man ein fast völlig bandenfreies Gel (Abb. 6,Gel Nr.2). Wird die Papain-Abdauung durch 15-min. Inkubation mit TLCK bei 25°C gestoppt, so sind zumindest noch alle niedermolekularen Proteinbanden inklusive der Aktinbande (A) deutlich zu erkennen (Abb. 6,Gel Nr.3). Bei Gel Nr. 4 wurde die unbehandelte Bürstensaummembran nach 1 Std. mit eiskalter Pufferlösung verdünnt, die sowohl Papain als auch TLCK enthielt, das Papain also bereits vor Zugabe inaktiviert war. Trotzdem konnten Proteinbanden abgedaut werden. Dies zeigt, daß auch TLCK nicht zur vollständigen Hemmung der Papainaktivität führt. Auffällig ist, daß auf dem bandenfreien Gel Papain auch die Aktinbande abgedaut hat. Da Aktin ein Protein aus der Core-Struktur ist, kann es, falls das vesiku-

läre Kompartiment bei der Proteasebehandlung intakt bleibt, durch externe Zugabe unmöglich abgedaut werden. Den Nachweis, daß bei den Versuchen das vesikuläre Kompartiment intakt bleibt, erhalten wir aus den Transportversuchen, wie wir später sehen werden. Durch die SDS-Zugabe beim Denaturieren wurden demnach die Vesikel geöffnet, so daß Papain, welches in Spuren zurückgeblieben oder eventuell an die Oberfläche gebunden war, das Aktin abdauen konnte. In Abwesenheit von SDS wie bei den Transportstudien und den Enzymmessungen scheint das zurückgebliebene Papain nicht weiter abdauen zu können. Dies geht aus den Daten von Tabelle 3 hervor. Hier konnte gezeigt werden, daß durch das Wegwaschen der Protease bei einer zweiten Inkubation keine weitere Verminderung von Enzymaktivitäten mehr zu finden ist. Es ist auch unwahrscheinlich, daß die Aktinabdauung während der Papain-Hydrolyse durch ein transientes Öffnen der Vesikel und ein "Internalisieren" von Papain zustande kommt. Dies geht aus den Daten von Abb. 6 hervor. Wie an Gel Nr. 3 zu sehen ist, bleibt bei der gleichermaßen mit Papain abgedauten Membran und anschließender TLCK-Inaktivierung des Papains die Aktinbande in der SDS-Gelelektrophorese deutlich erhalten. Daher müssen die bandenfreien Gele als Artefakte angesehen werden, die durch die Probenvorbereitung zur Gelelektrophorese auftreten.

Abbildung 4 zeigt die Gelelektrophorese für die Dünndarmmembranen nach Papain- und Trypsinbehandlung sowie die un-

behandelte Kontrollmembran. In diesen Versuchen wurde die Proteolyse immer durch 15-minütige Inkubation mit TLCK gestoppt. Bei Trypsinbehandlung bleiben die einzelnen Proteinbanden zwar alle erhalten, jedoch sind sie nicht mehr in ihrer ursprünglichen Intensität vorhanden (Abb. 4, Nr. 4 und 5). Besonders starke Intensitätsabnahme verzeichnet man bei den Banden I, SUC und 5-7. Nach Arbeiten von Semenza (17) enthält die Bande I (MG: 125000) Isomaltase und die Bande S (MG: 112000) Saccharase. Ein Abdauen der Saccharase-Bande durch Trypsin entspricht einem Rückgang der Saccharase-Enzymaktivität um 93 %. Bei den Papain-behandelten Darmmembranen ist das Gel vollkommen flach (Abb. 4 Nr. 2); allerdings ist auch hier wieder die Aktinbande, MG 45000 (18,19) teilweise mit abgedaut. Wie bereits erwähnt ist es nicht möglich, das Papain mit TLCK vollständig zu inaktivieren. Eventuell sitzt das noch verbliebene Papain so tief in der Glykokalixstruktur, daß es für das TLCK eben nur schwer zugänglich ist. Die Hemmung der Papainaktivität gelingt besser, wenn man nach Inkubation mit TLCK vor der Zugabe von SDS die Membranen noch 1 Minute bei 90°C mit TCA erhitzt. Bei dem auf diese Weise dargestellten Proteinmuster ist die Aktinbande wieder deutlicher vorhanden (Abb. 4 Nr. 6). Die Interpretation dieser Gele ist noch mit großer Unsicherheit behaftet. Es dürfte jedoch gelungen sein, wenigstens annähernd identische Proteolyse bei den Transportstudien, Enzymmessungen und Gel-Darstellungen zu erhalten.

Bei den Nierenmembranen (Abb. 5) läßt Trypsin die Proteinbanden mit niederen Molekulargewichten unbeeinflußt, es greift an den hohen MG an und dort besonders an Bande 7. Papain gelingt es. Bande 1 und 2 total zu entfernen und auch die Bande 7 fast vollständig abzudauen. Anders als Trypsin kann Papain auch die starken Banden 8 und 9 erheblich andauen.

Wenn die Ergebnisse der Elektrophorese aus den oben angeführten Gründen auch mit Vorsicht zu interpretieren sind, kann man doch vermuten, daß das Proteinmuster sowohl am Darm als auch an der Niere durch Papain stärker angegriffen wird als durch Trypsin. Dies würde im Einklang zu den Ergebnissen bei Messung der Enzymaktivitäten stehen. Auch hier finden wir in Darm und Niere eine größere Enzymaktivitätsminderung durch Papain als durch Trypsin. Widersprüchlich dazu erschienen jedoch die Ergebnisse bei der Proteinbestimmung. Hier führt Papain zu einem geringeren Proteinverlust als Trypsin. Es ist jedoch festzuhalten, daß durch die Lowry-Proteinbestimmung nicht nur intakte Membranproteine gemessen werden, sondern auch in der Membran zurückgehaltene Proteinfragmente. Durch die Solubilisierung mit SDS bei der Probenvorbereitung zur Elektrophorese ergibt sich eine Freisetzung derartiger Bruchstücke, die nun als niedermolekulare Peptide im Gel nicht mehr auftreten. Unerklärlich aus unseren Proteinbestimmungen (Tabelle 5) sind die Versuche von Maestracci (4), der bei Papainabdauung auf einen Proteinverlust, gemessen mit der Lowry-Methode, von 50 % kommt und

bei Trypsin nur auf 28 %. Dagegen gehen wir mit ihm konform, wenn wir die SDS-Elektrophorese als Kriterium für den Proteinabbau nehmen. Hier konnten wir einen intensiveren Abbau von Protein durch Papainbehandlung im Vergleich zu Trypsinbehandlung erzielen.

4. Einfluß der Proteasen auf den Na^+- abhängigen Glukosetransport in Bürstensaummembranvesikel

Für den Glukosetransport durch die Bürstensaummembran gibt es ein Transportsystem, das durch den elektrochemischen Gradienten von Na^+ getrieben wird und die Glukose durch Flußkopplung transportiert (20). Es sollte nun untersucht werden, inwieweit dieser Kotransportmechanismus durch Proteasen beeinflußt wird. Gleichzeitig wurde die spezifische Hemmung des Glukosetransports durch Phlorizin untersucht, die ebenfalls ein Kriterium für den trägervermittelten Glukosetransport darstellt. Zum Transport wurden Bürstensaummembranen genommen, welche eine Stunde mit der jeweiligen Protease inkubiert und wie in Abb. 3 und Tab. 6 dargestellt in ihrer Hydrolase-Aktivität gemindert waren. Zu jeder Transportmessung mit proteolytisch behandelten Membranen wurde eine solche mit unbehandelter Membran, die aus derselben Präparation kam, als Kontrolle durchgeführt. Abb. 7 zeigt das Glukosetransportverhalten an Darm und Niere mit Papain-behandelten (70 µg/ml) Bürstensaummembranen und der

unbehandelten Kontrollmembran. Bei der mit Papain behandelten Membran zeigen sich, abgesehen davon, daß die Gleichgewichtswerte etwas höher liegen als bei den Kontrollmembranen weder beim Darm noch bei der Niere Unterschiede im Transportverhalten. Die Na^+- stimulierbare Aufnahme von Glukose, die bei der Kontrolle einen Overshoot zeigt, ist ebenso erhalten geblieben wie die Hemmbarkeit des Na^+- stimulierten Transports durch Phlorizin. Die in der Abb. 7 gezeigten Transportraten beziehen sich alle auf Einzelexperimente, die jedoch mehrfach wiederholt wurden und qualitativ dieselben Ergebnisse zeigten.

Anders als mit Papainabdauung verhält es sich bei Abdauung mit Trypsin (Abb. 8). Während hier der Glukosetransport in Darmvesikel ebenfalls unbeeinflußt bleibt, fehlt bei der Niere der Overshoot der Glukoseaufnahme unter Na^+- Gradientbedingungen. Die Na^+- unabhängige Glukoseaufnahme bleibt hingegen unbeeinflußt, auch gibt es noch eine Hemmbarkeit des Na^+- stimulierten Transports durch Phlorizin. Es findet sich hier also noch ein Kotransport von Natrium und Substrat; dieser Transport findet aber nicht mehr gegen das Konzentrationsgefälle des Substrates statt. Obwohl Trypsin von den untersuchten Proteasen die Hydrolasen am wenigsten angreift, nämlich nur die LAP um 94 % in der Aktivität mindert und die übrigen Enzyme unbeeinflußt läßt, greift es im Gegensatz zu Papain derart in den Transportprozeß ein und beeinflußt wahrscheinlich das Trägersystem. Durch die mit den vorgenannten Proteasekonzentrationen

erzielte Proteolyse konnte nur in der Nierenmembran, nicht jedoch in der Darmmembran das Glukosetransportsystem durch Trypsin beeinflußt werden.

Es wurde nun versucht, durch eine 20-fache Erhöhung der Proteasenkonzentration den Glukosetransport ebenfalls auch mit Papain zu hemmen, oder mit einer erhöhten Trypsinkonzentration auch eine Beeinflussung in den Darmmembranen zu erreichen. Selbst bei 20-facher Proteasekonzentration und zwar sowohl der Trypsin- wie der Papainkonzentration war es nicht möglich, den Glukosetransport in die Darmvesikel in stärkerem Maße zu hemmen (Abb. 9, 10). Eindeutig ist jedoch die Hemmung an Nierenvesikeln durch die erhöhte Papainbehandlung (Abb. 10 b). Der Overshoot unter Na^+- Gradientbedingungen ist verloren gegangen. Eine leichte Na^+- Stimulation durch den Na^+- Gradienten gegenüber dem K^+- Gradienten bleibt jedoch erhalten.

5. Einfluß von Proteasen auf den Na^+- abhängigen Alanintransport in Bürstensaummembranvesikel

Auch die Alaninresorption läuft in der Bürstensaummembran über einen natriumgradient-getriebenen, trägervermittelten Transportmechanismus. Dieses Transportsystem ist nicht identisch mit dem Zucker-Transportsystem. Die Werte für den Alanintransport stammen aus derselben Versuchsreihe wie die Glukoseauf-

nahme, d.h. die Inkubationsmedien enthielten sowohl ^{14}C-Glukose als auch ^{3}H-Alanin. Als Hemmstoff für die Alaninaufnahme wurde 0,5 mM $HgCl_2$ dem Inkubationsmedium zugesetzt, welches in Äthanol gelöst war. Die Endkonzentration des Äthanol im Inkubationsmedium betrug 2 %. Beim Alanintransport sieht man bei den durch Papain abgedauten Membranen unter einem Na^+- Gradienten einen Overshoot in der Alaninaufnahme und die Hemmbarkeit des Transports durch $HgCl_2$ (Abb. 11). Die mit Trypsin oder Papain behandelten Dünndarmmembranen zeigen keinen Unterschied zur Kontrollmembran. Dagegen fehlt ebenso wie beim Glukosetransport bei den mit Trypsin behandelten Nierenvesikeln der Overshoot unter einem Na^+-Gradienten (Abb. 12 b). Trypsin scheint demnach das Aminosäuren-Transportsystem der Niere in ähnlicher Weise angreifen zu können wie das Zucker-Transportsystem.

Wie in Tabelle 6 ausgeführt, wird bei erhöhter Proteasenkonzentration für Papain am Darm die Aktivität der GGT, die bei niederen Konzentrationen unangetastet war, um 55 % gesenkt. Bei gleich erhöhter Papainkonzentration bleibt beim L-Alanintransport der Overshoot unter Na^+- Gradientbedingungen erhalten (Abb. 13 a). Ebenso wie der Glukosetransport wird der Alanintransport an der Niere durch erhöhte Papainbehandlung gestört. Das Overshoot-Phänomen ist nicht mehr nachweisbar, es kommt lediglich zu einer leichten Stimulation der Substrataufnahme durch den Na^+- Gradienten im Vergleich zum K^+- Gra-

dienten (Abb. 13 b). An der Beeinflussung der Nierenmembranhydrolasen hat sich durch die erhöhte Papainkonzentration kaum etwas geändert. Lediglich die Aktivität der GGT ist von zuvor 37 % um ca 55 % gesenkt worden (Tab. 6). Erhöhte Trypsinkonzentration (Enzymaktivitätsänderungen entnehme man Tabelle 6) führten an der Niere nicht nur zu einem Verlust des Overshoot-Phänomens sondern auch zu völligem Fehlen der Na^+- Stimulation. Beim Alanintransport in Darmvesikel führt verstärkte Trypsinbehandlung ebenfalls zu einer Beeinflussung der Transportraten. Erstmals fehlt auch hier das Overshoot-Phänomen (Abb. 14 a).

6. Hemmt $HgCl_2$ den Alanintransport oder zerstört es die Membranvesikel

$HgCl_2$ hemmt nicht nur den Alanintransport sondern wirkt auch unspezifisch auf die Membranvesikel, d.h. es erhöht deren Permeabilität und zerstört die geschlossenen BSMV. Diese Zerstörung der BSMV ist jedoch zeitabhängig. Nach 20 Sekunden Inkubation der BSMV mit Quecksilberchlorid ist erst eine geringe Schädigung der Vesikel eingetreten. Die Alaninaufnahme unter einem Na^+- Gradienten ist dagegen in Gegenwart von $HgCl_2$ bereits stark reduziert. Dies ist nur so zu erklären, daß $HgCl_2$ nicht allein zerstörend auf die Vesikel einwirkt, sondern auch noch spezifisch das Alanintransportsystem hemmt. Um zu

zeigen, daß die Minderung der Alaninaufnahme unter Na^+-Gradientbedingungen in Gegenwart von $HgCl_2$ nicht allein auf Permeabilitätsänderungen zurückzuführen ist, wurde gemessen wie groß der Alaninausstrom aus vorinkubierten Vesikeln unter Zugabe von $HgCl_2$ ist (Abb. 15). Es wurden behandelte und unbehandelte Membranvesikel eine Stunde bei 25°C in den Inkubationsmedien, wie sie für die Versuche zu Abbildungen 11-13 verwandt wurden, vorinkubiert (100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris pH 7,4, 100 mM NaSCN, 0,1 mM ^{14}C-markierte D-Glukose und 1 mM ^{3}H-markiertes L-Alanin). Die Alaninkonzentration im Vesikelinnern entsprach dem Gleichgewichtswert. Dann wurde die Messung durch Zugabe von 0,5 mM $HgCl_2$ und durch Zugabe desselben Volumens Äthanol gestartet. Gemessen wurde die Alaninkonzentration in pMol/Filter nach 20 Sekunden, 1 Minute und zweimal nach einer Stunde. Bei Zugabe von Äthanol müßte die Alaninkonzentration theoretisch bei allen Zeitpunkten gleich bleiben. Die Zunahme der Alaninkonzentration in den Versuchen wäre durch eine Vergrößerung des Intravesikulärraums durch Äthanoleinwirkung zu erklären. Bei Zugabe von Quecksilberchlorid wurde eine niedrigere Alaninkonzentration in den Vesikeln als bei bloßer Zugabe von Äthanol gemessen. Die Differenz entspricht dem Verlust des Alanins durch Zerstörung der Vesikel. Der Verlust wird mit zunehmender Inkubationszeit immer größer, ist aber nach 20 Sekunden noch relativ gering. Bei unbehandelten Darmvesikeln beträgt der Verlust 7 %, bei der Niere 19 %. Bei den mit Trypsin abgedauten Darmvesikel waren

es nach 20 Sekunden Inkubation 24 % Verlust, und bei den mit Elastase abgedauten Nierenvesikeln 31 %. Da aber die Stimulation des Na^+- Gradienten mit $HgCl_2$ beim unbehandelten Darmvesikel um 29-46 % abnimmt, bei der Niere um 71-80 %, bei den abgedauten Darmvesikeln um 34-61 % und bei den Nierenvesikeln um 74-83 % ist dies nicht allein mit der unspezifischen Einwirkung des $HgCl_2$ zu erklären, sondern muß auch auf die Hemmung des Alanintransportsystems durch $HgCl_2$ zurückgeführt werden.

7. Papaineinfluß auf den Na^+- abhängigen Phosphattransport in Bürstensaummembranvesikel

Auch für anorganisches Phosphat existiert ein Na^+- abhängiges Transportsystem in der Bürstensaummembran. Da es in der Literatur viele verschiedenartige Spekulationen über die Beteiligung der Alkalischen Phosphatase an diesem Transportsystem gibt, war es interessant, Phosphattransportstudien mit BSMV zu betreiben, die proteasebehandelt waren, und einen Vergleich zwischen AP und Phosphattransport anzustellen. Wir wählten daher mit Papain behandele Vesikel, weil damit am Darm ein Aktivitätsverlust der AP um 81 % zu erzielen war. An der Niere konnte die AP durch Papainbehandlung mit niedrigerer (70 ug/ml) Konzentration nicht beeinträchtigt werden. In den vorliegenden Versuchen wurde die Phosphataufnahme in Bürstensaummembran-

vesikel von Darm und Niere unter einem K^+- Gradienten, einem Na^+- Gradienten und einem Gleichgewicht der Na^+- Ionen, d. h. gleiche Na^+- Konzentration auf der Innen- und Außenseite der Vesikel, gemessen (Abb. 16). Um innerhalb und außerhalb der Vesikel die gleiche Na^+- Konzentration zu haben, wurden die Vesikel eine Stunde bei 0^oC mit 1 M NaSCN im Verhältnis 9:10 vorinkubiert, so daß sie zu Beginn der Transportstudien mit 100 mM NaSCN im Vesikelinnern beladen waren. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris pH 7,4, 0,1 mM ^3H-markierte D-Glukose, 0,17 mM ^{33}P-markiertes Phosphat und 100 mM NaSCN bzw. KSCN. Bei den unbehandelten Dünndarmmembranen zeigt sich eine deutliche Stimulation der Phosphataufnahme unter Na^+- Gradientbedingungen gegenüber Na^+-äquilibrierten Bedingungen und der Abwesenheit von Na^+- Ionen (Abb. 16 a). Bei den Nierenvesikeln kommt es zu einem Overshoot in der initialen Phosphataufnahme (Abb. 16 b). Bei den mit Papain abgedauten Membranen kommt es weder im Darm noch in der Niere zu einer Stimulation durch den Na^+- Gradienten. Es findet sich in diesem Versuch kein Anhalt dafür, daß in die abgedauten Vesikel hinein noch ein Na^+- Phosphatkotransport stattfindet. Auch die AP scheint nicht direkt mit diesem Transport gekoppelt zu sein. Zwar läuft die Hemmung des Phosphattransports im Darm mit der Hemmung der AP parallel, aber auch in der Niere kommt es zu einer Hemmung des Phosphattransports trotz erhaltener Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase. Die Ursache der Hemmung des Phosphattransports

scheint also nicht in der Hemmung der AP zu liegen. Eine passive Substrataufnahme findet bis zum Gleichgewichtswert statt. Bei einer Erhöhung der Papainkonzentration, mit der es möglich war auch an der Niere die Aktivität der AP um 39 % zu verringern, konnten keine Änderungen im Transportverhalten mehr erwartet werden. Weder bei der hohen noch bei der geringeren Papainkonzentration war in Darm oder Niere ein Unterschied in der Substrataufnahme unter Na^+- Gradient-, K^+- Gradientbedingungen oder Na^+- äquilibrierten Vesikeln zu finden.

8. Elektronenmikroskopische Darstellung der proteolytisch behandelten Bürstensaummembranvesikel

Bei der elektronenmikroskopischen Darstellung ging es hauptsächlich um zwei Fragestellungen. Zum einen sollte gezeigt werden, daß es sich bei den Vesikeln auch nach proteolytischer Behandlung noch um geschlossene Gebilde handelt, in deren Innenräume hinein die untersuchten Substanzen transportiert wurden. Außerdem sollte vor allem Form und Größe der proteolytisch behandelten Membranen im Vergleich zu unbehandelten betrachtet werden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob mikroskopisch ein Abdauen der Proteine bei Behandlung zu sehen ist. Dafür wurden die Membranen im Negativ-Staining beurteilt, bei dem sich am Rand der einzelnen Membranen kleine "knobs" darstellen, auf denen ein Großteil der Proteine sitzen soll.

Bei der Gefrierbruchätzung hingegen versucht man die Proteine zu beurteilen, die tiefer in der Membran verankert sind. Die proteolytische Behandlung betrug eine Stunde mit 70 µg/ml Papain bzw. 1,4 mg/ml Trypsin. Bei der Einbettung sieht man am Darm mit Papain- Behandlung keinen Unterschied zu den Kontrollmembranen. Die Darmvesikel mit Trypsinbehandlung sehen dagegen angegriffen aus; man hat evtl. den Eindruck, als ob sie auch leicht angeschwollen sind, der Vesikelinnenraum also größer wurde. (Abb. 17) Bei der Niere läßt sich im Schnitt kein Unterschied zwischen Kontrollmembran und abgedauten Membranen erkennen. In Negativ-Staining dagegen kann man am Darm und noch besser an der Niere erkennen, daß nach Proteasenbehandlung der Rand mit den einzelnen "knops" glatter wird und bei einzelnen Membranvesikeln besonders bei Papainabdauung die "knobs" ganz verschwinden (Abb. 18). Bei Trypsinbehandlung ist die Partikelminderung am Darm nicht so deutlich ausgeprägt wie an der Niere (Abb. 19). Insgesamt wirkt sowohl am Darm als auch an der Niere Papain stärker auf die Partikel als Trypsin. Dies steht in Parallele zu unserem Befund, daß Papain auch bei der Gelelektrophorese stärker auf die Proteinbanden wirkt als Trypsin. Die Beurteilung der Gefrierbruchätzung ist schwierig, da bereits auf dern Kontrollmembranen die Partıkel auf den Bruchstellen nicht gleichmäßig verteilt sind. So sind an der Niere ebenso wie bei Einbettung auch bei der Gefrierbruchätzung keine Unterschiede zwischen abgedauter- und Kontrollmembran zu sehen. Am Darm gewinnt man den Eindruck, daß intramembrale Partikel

nach Papainbehandlung verschwinden. Auch nach Trypsinbehandlung sind die Partikel etwas weniger geworden (Abb.20).

DISKUSSION

In der Diskussion sollen die anfangs gestellten Fragen näher beleuchtet werden.

a. Einwirkung von Proteasen auf das Transportverhalten von Bürstensaummembranvesikeln

Durch unsere Transportversuche konnten wir zeigen, daß bei niedriger dosierter Papainbehandlung (70 µg/ml) der BSMV vom Dünndarm das Glukose- und Alanintransportsystem unbeeinflußt bleibt, während der sekundär aktive Phosphattransport zum Erliegen kommt. Ebenso sieht es in Nierenbürstensaummembranvesikeln aus: Die Glukose- und Alaninaufnahme ist bei Papainbehandlung unbeeinflußt, ein Na^+ - Phosphatkotransport nicht mehr möglich. Von den untersuchten drei Transportsystemem der Bürstensaummembran ist demnach eines, nämlich das Phosphattransportsystem durch Papain angreifbar und die anderen beiden, das Glukose- und Alanintransportsystem nicht angreifbar.

Bei niedrig dosierter Trypsinbehandlung (1,4mg/ml) wurde nur der Glukose- und Alanintransport gemessen. Am Darm kommt es ebenso wie durch Papainbehandlung nicht zu einer Hemmung der untersuchten Transportsysteme. An der Niere hingegen kommt

es zu einer Hemmung des Na^+ - gekoppelten Transports sowohl von Glukose als auch von Alanin. Diese Hemmung ist zwar nicht so stark wie die Hemmung des Phosphattransports durch Papain, aber dennoch beträchtlich. Man sieht in dieser Versuchsserie, daß nicht nur die einzelnen Transportsysteme gegenüber Proteasen unterschiedlich reagieren, sondern daß es auch Unterschiede zwischen der Bürstensaummembran von Darm und Niere gibt. Die Transportsysteme in der Nierenbürstensaummembran sind leichter anzugreifen als die im Dünndarm.

b. Einfluß von Proteasen auf membrangebundene Enzyme

Ein unterschiedliches Verhalten der Bürstensaummembran von Darm und Niere zeigt sich auch beim Vergleich des Abdauverhaltens in beiden Organen in Bezug auf membrangebundene Hydrolasen. Durch die Inkubation der Dünndarmbürstensaummembran mit Papain werden 81 % der Maltase, 71 % der SUC, 83 % der AP sowie 48 % der LAP abgedaut; bei Membranen vom proximalen Tubulus konnten 100 % der Maltase, 96 % der LAP und 37 % der GGT abgedaut werden. Bei den Darmmembranen wurde die GGT wie auch die TRE nicht abgedaut, während in Membranen von der Niere die AP nicht angegriffen wurde. Die Enzyme werden also in Darm und Niere von Papain unterschiedlich beeinflußt. Dieses unterschiedliche Abdaumuster läßt sich dadurch erklären, daß die membrangebundenen Enzyme in Darm und Niere unterschiedliche

Schutzfaktoren gegen Proteolyse besitzen. Eine unterschiedliche Lokalisation der einzelnen Enzyme in Darm und Niere ist wie bereits erwähnt unwahrscheinlich, da z.B. am Darm einmal die Maltase und einmal die Leucinaminopeptidase durch die verschiedenen Proteasen stärker abgedaut wird. Der stärkere Schutz der Darmmembranen gegenüber Proteolyse im Vergleich zu den Nierenmembranen macht sich auch bei den Transportsystemen bemerkbar. So bleibt der Glukose- und Alanintransport im Darm nach Abdauung unverändert, während er in der Niere gehemmt wird.

Vergleicht man die Proteolyse des Transportsystems mit der Proteolyse der Hydrolasen, so zeigt sich bei Papaineinwirkung nicht nur ein Unterschied zwischen Darm und Niere sondern auch innerhalb der BSM ein Unterschied zwischen den membrangebundenen Systemen. Die Transportsysteme sind gegen Papainabdauung weitgehend geschützt, dagegen werden die Hydrolasen durch Papain angegriffen. Interessant ist außerdem, daß Papain im Vergleich zu Trypsin den größeren Effekt im Hinblick auf Hydrolasenaktivität, Verschwinden von Membranproteinen in der Elektrophorese und im elektronenmikroskopischen Bild zeigt, daß aber nur Trypsin in der Lage ist, an der Nierenmembran das Glukose- und Alanintransportsystem zu beeinflussen. Das Phosphattransportsystem scheint ähnlich beeinflußbar zu sein, wie die Hydrolasen, da es ebenfalls durch Papainbehandlung anzugreifen ist.

c. Beziehung zwischen Transport und membranständigen Enzymen

Trotz des Hinweises auf ähnliche Beeinflussung von Phosphattransportsystem und Hydrolasen können wir keinen Zusammenhang zwischen Phosphattransport und alkalischer Phosphatase sehen. Der Na^+- gekoppelte Phosphattransport kommt sowohl im Darm als auch in der Niere nach Papainbehandlung völlig zum Erliegen. In der Niere können wir aber zeigen, daß die Aktivität der AP noch unangetastet ist. Würde die AP die maßgebliche Rolle beim Phosphattransport spielen, so müßte der Transport in der Niere noch vorhanden sein. Da aber kein Na^+- Phosphatkotransport mehr stattfindet, kann durch unsere Befunde die These einer Beziehung zwischen AP und Phosphattransport an der Niere nicht gestützt werden. Es muß vielmehr durch Papainbehandlung ein anderes tragendes Element des Phosphattransportes gestört worden sein. Ebenfalls nicht stützen läßt sich durch diese Arbeit ein Zusammenhang zwischen GGT und Aminosäuretransport. An der Niere wird durch niedrig dosierte Papainbehandlung (70 µg/ml) die Enzymaktivität der GGT um 37 % vermindert, während der Alanintransport unbeeinflußt bleibt. Bei einer erhöhten Papainbehandlung (1,6 mg/ml) geht die Enzymaktivität der GGT sogar um 95 % verloren, wobei nun auch der Alanintransport gehemmt wird. Nach der These von Meister und Orlowski, daß die GGT für die Bindung des Alanins an das Transportenzym und die Translokation verantwortlich ist, dürfte jedoch bei fast vollständigem Aktivitätsverlust kein

Transport mehr stattfinden. Zwar wird durch diese massive Papainabdauung der Transport gehemmt, indem das Overshoot-Phänomen zum Erliegen kommt, doch ist noch eine Stimulation der Aufnahme durch einen Na^+- Gradienten gegenüber einem K^+- Gradienten nachweisbar. Am Darm wird durch massive Papainabdauung 55 % der GGT - Aktivität gehemmt, und hier ist der Overshoot unter Natriumgradienten-Bedingungen noch deutlich. Durch Trypsinbehandlung wird bereits bei der geringeren Konzentration der Alanintransport gehemmt, dabei war die GGT in ihrer Aktivität unbeeinflußt. Es gibt sicher keine Beziehung zwischen Glukosetransport und Maltaseaktivität. Beim Darm wird um 81 %, an der Niere um 100 % Maltaseaktivitätsverlust durch Papain erreicht, jedoch bleibt der Glukosetransport völlig in Ordnung. Durch Trypsinbehandlung bleibt zwar die Maltase ungehemmt, dafür wird der Glukosetransport zumindest in der Niere beeinflußt.

d. Abdauung der BSMV und Proteinmuster

Der Versuch einer Korrelierung zwischen Transportaktivität und spezifischem Proteinverlust, wie er durch die SDS-Elektrophorese dargestellt wurde, wird in dieser Arbeit nicht angegangen. In Anbetracht der Komplexität des Proteinmusters waren etwaige Schlüsse daraus als zu spekulativ anzusehen. Außerdem ergeben sich wie oben erwähnt, als Folge der Proteaseinakti-

vierung Schwierigkeiten bei der Interpretation der Proteinmuster.

Noronha-Blob (21) hat Bürstensaummembranvesikel des Kaninchens mit Papain behandelt. Auch sie fand, daß der Phosphattransport von der AP zu trennen ist und durch Papainbehandlung gehemmt wird, während der Glukosetransport nicht gehemmt wird. Die GGT konnte in der Nierenmembran des Kaninchens nicht beeinflußt werden, wogegen sie in der Nierenmembran der Ratte, wie in der Arbeit gezeigt wurde, beeinflußbar ist. Ihre Ergebnisse auf SDS-Polyacrylamid-Gel, wonach sie nur noch Polypeptide von 18.000 MG sieht, damit aber noch intakte Natrium-abhängige Glukoseaufnahme sieht, möchten wir anhand unserer Arbeit mit Skepsis betrachten. Bei Polypeptiden unter 18.000 MG ist keine Aktinbande, deren Molekulargewicht bei 45.000 liegt, mehr auf dem Gel zu sehen.Ohne diese Aktinbande sind jedoch die Vesikel nicht mehr intakt. Es ist anzunehmen, daß wie zuvor beschrieben durch die SDS-Zugabe Papain neue Möglichkeiten der Abdauung erhielt, die bei den Transportversuchen nicht gegeben waren.

Mit der Papainabdauung von BSMV befassen sich in letzter Zeit eine Reihe weiterer Autoren. So gelang auch Tsao und Curthoys (22) sowie Berteloot et al (23) eine "Solubilization" der GGT-Aktivität von 90 - 95 %. Letztgenannte Autoren konnten mit den GGT - aktivitätsgeminderten Vesikeln noch intakten Leucintransport nachweisen und dadurch die GGT - Aktivität

vom Leucintransport trennen. Damit ist mit Hilfe einer weiteren neutralen Aminosäure gezeigt worden, daß keine Beziehung zwischen deren Transport und der GGT - Aktivität besteht.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Proteolyse der Bürstensaummembranen von Darm und Niere mit Papain und Trypsin wurden Transporteigenschaften, Enzymaktivitäten und Membranstrukturen untersucht.

Durch Proteolyse mit Papain wurden die Hydrolasen im Darm anders als in der Niere beeinflußt. Es zeigte sich ein unterschiedliches Abdaumuster. Der Glukose- und Alanintransport bleibt sowohl im Darm als auch in der Niere durch Papainbehandlung unbeeinflußt. In beiden Organen kommt jedoch der aktive Phosphattransport zum Erliegen. Durch 20-fache Erhöhung der Papainkonzentration erreicht man lediglich in der Niere auch eine Hemmung des Glukose- und Alanintransports. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen sieht man im Negativkontrast eine Partikelabnahme. Die "knobs", auf denen die Enzyme sitzen sollen, verschwinden fast gänzlich. Auch in der Gefrierbruchätzung sieht man andeutungsweise an der Darmmembran eine Abnahme der Partikel.

Durch Proteolyse mit Trypsin erzielt man eine schwächere Beeinflussung der Hydrolasen, Protein- Gelelektrophoresemuster und Partikelminderungen als durch Papain. Der Glukose- und Alanintransport wird jedoch in der Niere schon bei niedriger Konzentration gehemmt. Bei erhöhter Konzentration kommt

der aktive Transport völlig zum Erliegen, und auch der Transport im Darm wird gehemmt. In der Gelelektrophorese zeigt sich ein Andauen hoher Molekulargewichte, am Darm besonders Isomaltase und Saccharase. Elektronenmikroskopisch zeigt sich auch durch Trypsin eine Partikelabnahme.

Es konnten durch die Proteolyse zahlreiche Unterschiede aufgezeigt werden. Mit Hilfe der Papainabdauung wurden Unterschiede zwischen den untersuchten Transportsystemen unabhängig von der Organzugehörigkeit deutlich. Der Phosphattransport ist gegenüber Papainabdauung labil. Das Glukose- und Alanintransportsystem besitzt einen Schutz. Durch die Trypsinabdauung konnte ein Unterschied der Darm- und Nierenmembran gezeigt werden. Während der Glukose- und Alanintransport nach niederer Trypsinkonzentration am Darm unbeeinflußt ist, wird er in der Niere durch Trypsin gehemmt. Eine Erklärung dafür wären unterschiedliche Schutzfaktoren gegen Proteolyse. Dies würde auch das unterschiedliche Abdaumuster der Hydrolasen in Darm und Niere erklären.

Es ergab sich ferner kein Hinweis für einen Zusammenhang zwischen Phosphattransport und alkalischer Phosphatase bzw. Alanintransport und γ - Glutamyltranspeptidase. Sicher besteht kein Zusammenhang zwischen Glukosetransport und Maltase.

TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1 Präparation der BSMV von Rattenjejuna
(Tabelle nach Evers (9))

Mukosa von 5-10 Rattenjejuna in 30 ml Mannitol 300 mM/ Tris 12 mM- HCl pH 7,1- Puffer wird mit bidest. Wasser 1:5 verdünnt und homogenisiert, mit $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM/l versetzt und 15 Minuten stehen gelassen.

Zentrifugation 15 Minuten 7700 g

Überstand U_1 ↓

Zentrifugation 30 Minuten 20400 g

Sediment S_2 ↓

Resuspension in 70 ml
100 mM Mannitol/20mM Hepes
Tris pH 7,4- Puffer,
versetzt mit $CaCl_2$ in 10mM/l
Endkonzentration.
Nach 15 Minuten

Zentrifugation 15 Minuten 7700 g

Überstand U_3 ↓

Zentrifugation 30 Minuten 20400 g

Sediment S_4 ↓

Resuspension in 2 ml
100 mM Mannitol/20mM Hepes
Tris pH 7,4- Puffer

Zentrifugation 5 Minuten 1900 g

Überstand U_5 ↓

Im Überstand U_5 ist die für die Abdauversuche verwendete Bürstensaummembranvesikelfraktion.

Tabelle 2 Präparation der BSMV von Rattennierenrinden
(Tabelle nach Evers (9))

3 g Nierenrindengewebe wird in 10 mM Mannitol/ 2mM Tris-HCl pH 7,1- Puffer im Verhältnis 1:10 homogenisiert, mit $CaCl_2$ in einer Endkonzentration von 10 mM/l versetzt und nach 15 Minuten mit obigem Puffer plus $CaCl_2$ nochmals 1:1 verdünnt.

Zentrifugation 12 Minuten 120 g

Überstand U_1 abpipettiert ↓

Zentrifugation 12 Minuten 12000 g

Sediment S_2 ↓

Resuspension in 15 ml
100 mM Mannitol/20 mM Hepes
Tris pH 7,4 - Puffer,
versetzt mit $CaCl_2$ in 10 mM/l
Endkonzentration. Nach 15 Min.
mit demselben Puffer + $CaCl_2$
1:1 verdünnt.

Zentrifugation 12 Minuten 1900 g

Überstand U_3 ↓

Zentrifugation 20 Minuten 30000 g

Sediment S_4 ↓

Resuspension in 1,5 ml
100 mM Mannitol/20 mM Hepes
Tris pH 7,4- Puffer

Zentrifugation 5 Minuten 1900 g

Überstand U_5 ↓

Im Überstand U_5 ist die für die Abdauversuche verwendete Bürstensaumvesikelfraktion.

Tabelle 3 Hemmung der Proteasenwirkung

BSMV des Darmes wurden mit Papain proteolytisch behandelt. Die Proteolyse wurde nach 30 Sek., 5 Min. und nach 1 Stunde gestoppt. Bei einer Hälfte der Vesikel wurde der Enzymaktivitätsverlust ohne weitere Inkubation bestimmt. Die andere Hälfte wurde zuvor nochmals bei 25°C 30 Minuten inkubiert, um die Möglichkeit der weiteren Abdauung zu provozieren. Die Trehalase konnte wegen schwankender Normwerte nicht berücksichtigt werden.

	AP		GGT		LAP		MAL		SUC	
	ohne Ink.	mit Ink.	ohne Ink.	mit Ink.	ohne Ink.	mit Ink.	ohne Ink.	mit Ink.	ohne Ink.	mit Ink.
% Aktiv.-verlust n. 30 Sek.	83	84	0	0	71	71	83	81	77	80
% Aktiv.-verlust n. 5 Minuten	88	88	0	0	78	76	89	88	84	84
% Aktiv.-verlust n. 1 Stunde	95	95	0	0	93	93	96	95	91	91

Tabelle 4 Anreicherung der Enzymaktivität durch Vesikelpräparation.

Gemessen wurden die einzelnen Enzymaktivitäten zu Beginn der Präparation im Gesamthomogenat und am Ende der Präparation in der Vesikelfraktion, und daraus wurde die Anreicherung der Enzyme errechnet.

	mU/mg Prot. i.Homogenat ±Stdt.abw.	mU/mg Prot. i.Vesikelf. ±Stdt.abw.	Anreicher. i.Vesikelf. ±Stdt.abw.
	D Ü N N D A R M		
AP n=19	761±175	11607±2258	16±4
GGT n=15	16± 6	179± 61	12±4
LAP n=19	48± 10	767± 153	16±4
MAL n=22	570±140	9373±2254	17±6
TRE n=14	46± 17	286± 99	7±3
SUC n=24	66± 14	702± 180	12±4
	N I E R E		
AP n=14	1803±467	21128±3490	12±4
GGT n=12	459± 74	4170± 939	10±3
LAP n=15	57± 8	627± 114	11±3
MAL n=16	263± 60	3774±1180	15±5
TRE n=8	9± 5	29± 16	3±2

Tabelle 5 Proteinverlust bei Abdauung

Proteinmessung nach der Methode von Lowry. Der Proteingehalt der jeweiligen unbehandelten Kontrollmembran wurde auf 100% gesetzt. Angegeben wird der Proteinverlust in Bezug auf das Gesamtprotein nach einer Stunde Abdauzeit mit 70 µg/ml Papain und 1,4 mg/ml Trypsin.

	% Proteinverlust bei Abdauung durch	
	Papain	Trypsin
Darm n=6	5 ± 5	12 ± 9
Niere n=4	10 ± 3	13 ± 5

Tabelle 6 Enzymaktivitätsverlust nach proteolytischer Behandlung.

Ohne Klammern ist der Aktivitätsverlust der einzelnen Enzyme mit 70 µg/ml Papainbehandlung bzw. 1,4 mg/ml Trypsinbehandlung nach 1 Std. Abdauzeit ± Standardabweichung wiedergegeben. Am Darm wurden n=6 Versuche, an der Niere für Trypsin ebenfalls n=6 und für Papain nur n=4 Versuche gemittelt. In Klammern sind die Werte für erhöhte Proteasenkonz. angegeben. Papain: 1,6 mg/ml und n=2; Trypsin an der Niere: 20mg/ml und n=1; Trypsin am Darm: 28mg/ml und n=1.
(x) Hier konnten keine eindeutigen Ergebnisse gemessen werden.

	DÜNNDARM	
	% Aktivit.verl. d. Papain	% Aktivit.verl. d. Trypsin
AP	83 ± 6 (95 ± 1)	0 (39)
GGT	0 (55 ± 21)	4 ± 8 (91)
LAP	48 ± 9 (97 ± 5)	31 ± 14 (71)
MAL	81 ± 9 (97 ± 1)	9 ± 6 (56)
TRE	4 ± 6 (x)	0 (0)
SUC	71 ± 14 (95 ± 1	94 ± 2 (97)
	NIERE	
AP	1 ± 2 (x)	0 (17)
GGT	37 ± 3 (95 ± 2)	0 (60)
LAP	96 ± 5 (99 ± 1)	92 ± 7 (92)
MAL	100 ± 1 (100 ± 1)	1 ± 3 (93)
TRE	81 ± 24 (77 ± 33)	0 (0)

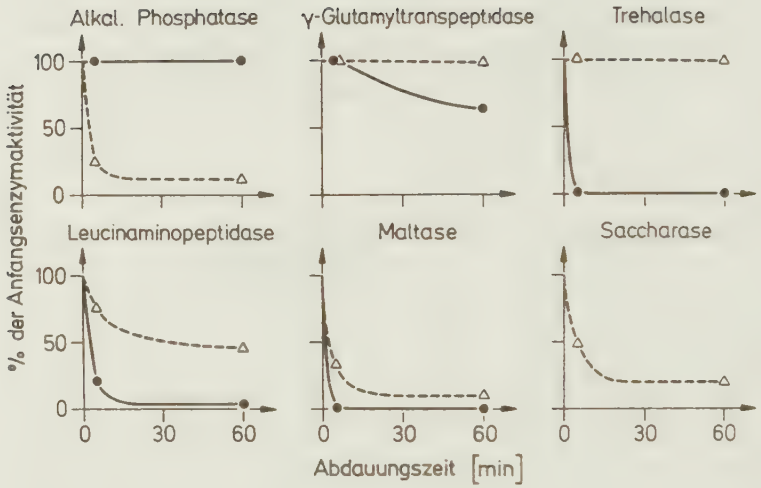

Abb. 1 Durch Papain verursachte Aktivitätsminderungen membrangebundener Enzyme.
Abdauung der Bürstensaummembranenzyme durch 70 µg/ml Papain (2-4 mg Bürstensaumprotein/ml) an Darm Δ----Δ und Niere ●——● .
Die Werte geben die Enzymaktivität in % der Anfangsaktivität nach 5 Min. und 1 Stunde Abdauung an. Es handelt sich um Einfachbestimmungen, deren Tendenz jedoch in mehreren Experimenten bestätigt wurde.

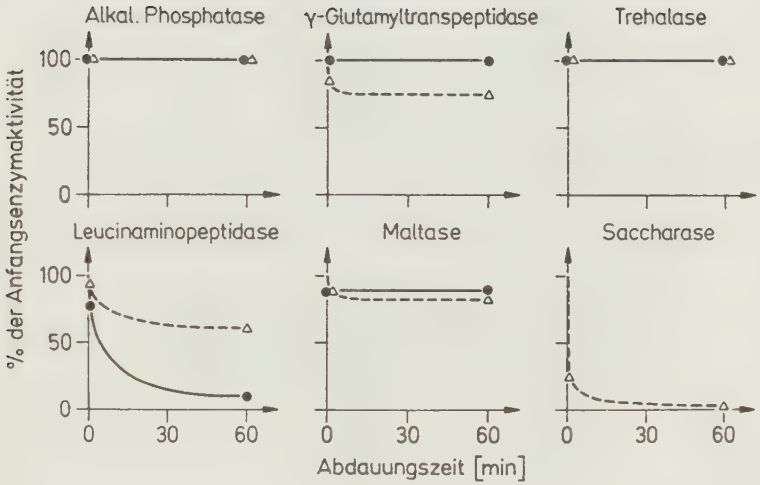

Abb. 2 Durch Trypsin verursachte Aktivitätsminderungen membrangebundener Enzyme.
Abdauung der Bürstensaummembranenzyme durch 1,4 mg/ml Trypsin (2-4 mg Bürstensaumprotein/ml) an Darm Δ----Δ und Niere ●——● .
Die Werte geben die Enzymaktivität in % der Anfangsaktivität nach 30 Sek. und 1 Stunde Abdauung an. Es handelt sich um Einfachbestimmungen, deren Tendenz jedoch in mehreren Experimenten bestätigt wurde.

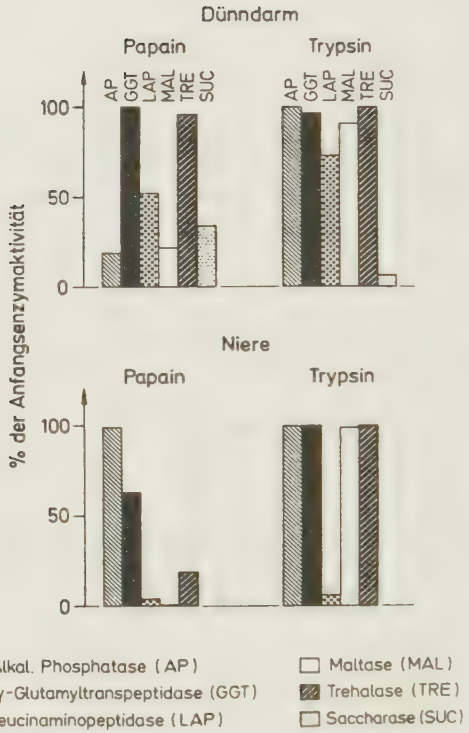

Abb. 3 Einfluß von Papain und Trypsin auf die Enzymaktivitäten in Bürstensaummembranvesikeln. Dargestellt wird der Verlust der Enzymaktivität nach 1 Stunde Inkubation mit der jeweiligen Protease. Für den Darm ist n=6, für die Niere n=4. Die Konzentration der Proteasen betrug für Papain 70 µg/ml und für Trypsin 1,4 mg/ml. Das Bürstensaummembran-Protein des Darms und der Niere lag zwischen 2 und 4 mg/ml.

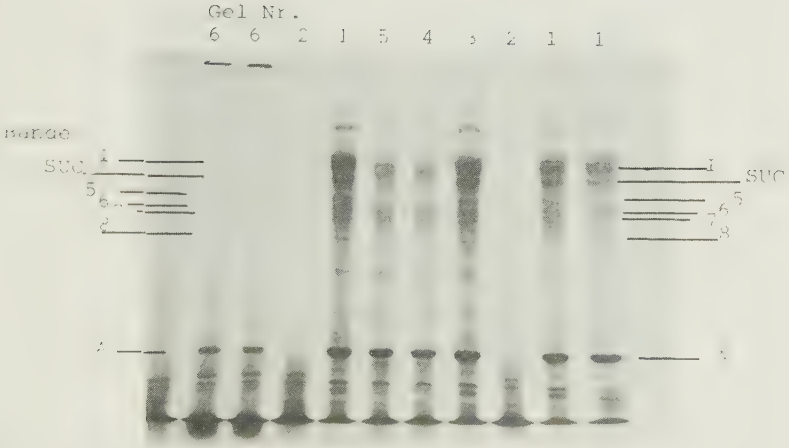

Abb. 4 Proteinauftrennung der Dünndarm- BSMV durch Plattengelelektrophorese nach 1 Stunde proteolytischer Behandlung und anschließender 15-minütiger Inkubation mit 1 mM TLCK

Gel Nr. 1: Kontrollmembran
Gel Nr. 2: Inkubation mit 35 µg/ml Papain
Gel Nr. 3: Kontrollmembran + 40 mM KCN
Gel Nr. 4: Inkubation mit 0,7 mg/ml Trypsin
Gel Nr. 5: Inkubation mit 0,7 mg/ml Trypsin und 40 mM KCN
Gel Nr. 6: Inkubation mit 35 µg/ml Papain und 2-minütiger Hitzedenaturierung vor SDS-Zugabe

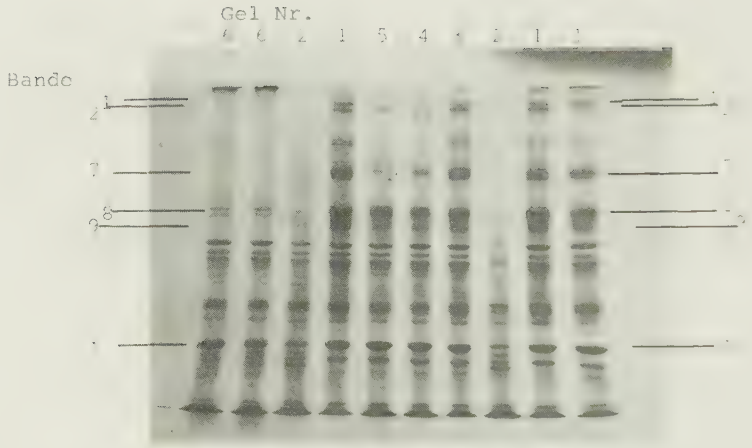

Abb. 5 Proteinauftrennung der Nieren- BSMV durch Plattengelelektrophorese nach 1 Stunde proteolytischer Behandlung und anschließender 15-minütiger Inkubation mit 1 mM TLCK.

Gel Nr. 1: Kontrollmembran
Gel Nr. 2: Inkubation mit 35 µg/ml Papain
Gel Nr. 3: Kontrollmembran + 40 mM KCN
Gel Nr. 4: Inkubation mit 0,7 mg/ml Trypsin
Gel Nr. 5: Inkubation mit 0,7 mg/ml Trypsin und 40 mM KCN
Gel Nr. 6: Inkubation mit 35 µg/ml Papain und 2-minütiger Hitzedenaturierung vor SDS-Zugabe

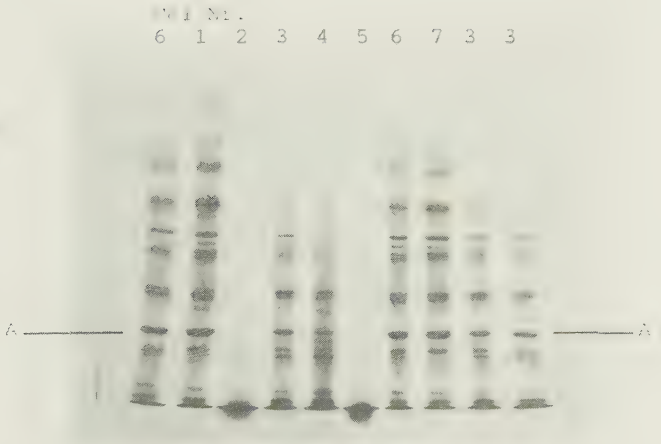

Abb. 6 Reaktivierung der Papainaktivität bei Zugabe von SDS.
Proteinauftrennung der Nieren - BSMV durch Plattengelelektrophorese nach 1 Stunde Inkubation bei 25 °C und anschließender 35-facher Verdünnung in eiskalter Pufferlösung.

Gel Nr. 1: Kontrollmembran
Gel Nr. 2: Inkubation mit 35 µg/ml Papain und Stoppen der Reaktion durch Verdünnung
Gel Nr. 3: Inkubation mit 35 µg/ml Papain und Stoppen der Reaktion durch 15-min. Inkubation mit 1 mM TLCK bei 25 °C und danach Verdünnung
Gel Nr. 4: Bürstensaummembran nach 1 Stunde durch eiskalte Pufferlösung, die mit Papain und TLCK versetzt war, verdünnt
Gel Nr. 5: Bürstensaummembran nach 1 Stunde durch eiskalte Pufferlösung, die mit Papain ohne TLCK versetzt war, verdünnt
Gel Nr. 6: Kontrollmembran mit 40 mM KCN nach 1 Std. durch eiskalte Pufferlösung verdünnt
Gel Nr. 7: Kontrollmembran nach 1 Std. zunächst 15 Min. mit 1 mM TLCK versetzt und danach in eiskalter Pufferlösung verdünnt

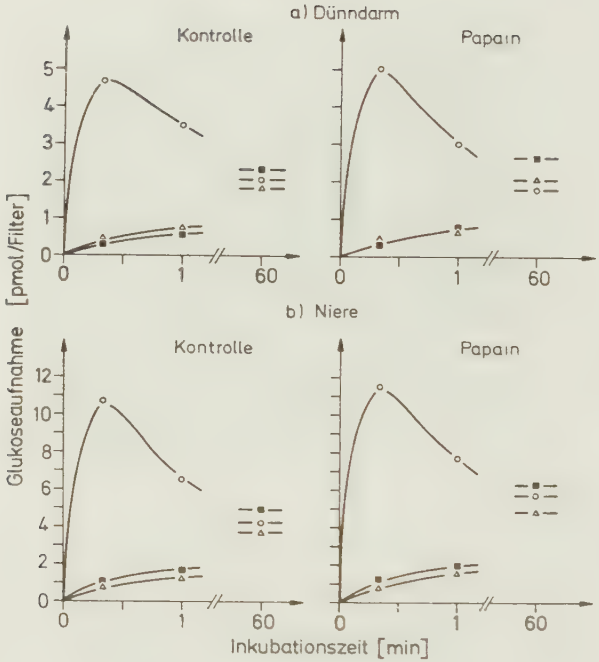

Abb. 7 Na^+- abhängiger D-Glukosetransport durch Papain (70 µg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere.
Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM Alanin und
a) 100 mM NaSCN —○—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,2 mM Phlorizin —△—

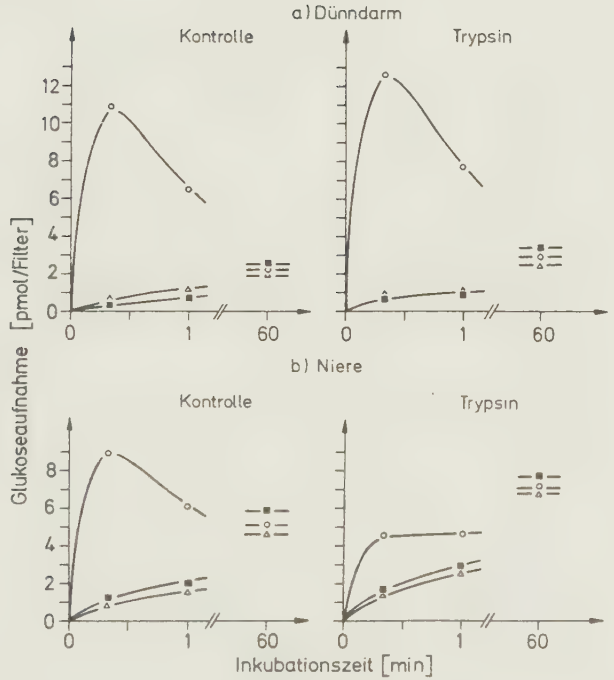

Abb. 8 Na^+- abhängiger D-Glukosetransport durch Trypsin (1,4 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere.
Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —○—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,2 mM Phlorizin —△—

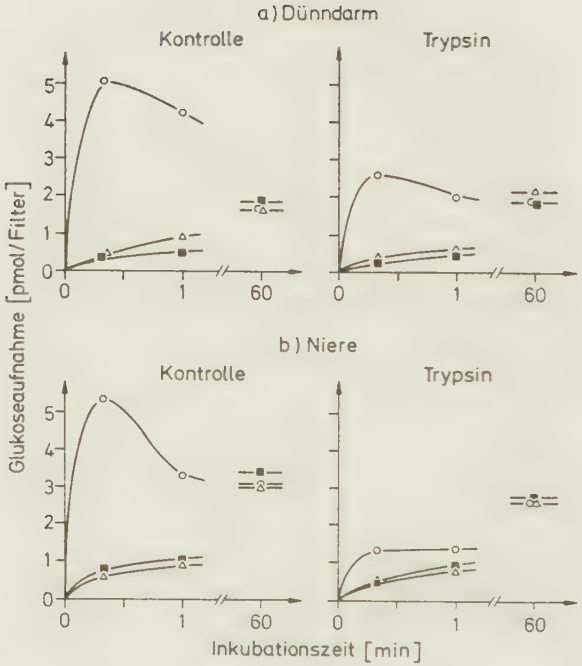

Abb. 9 Na^+- abhängiger D-Glukosetransport durch Trypsin (20 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere. Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —o—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,2 mM Phlorizin —△—

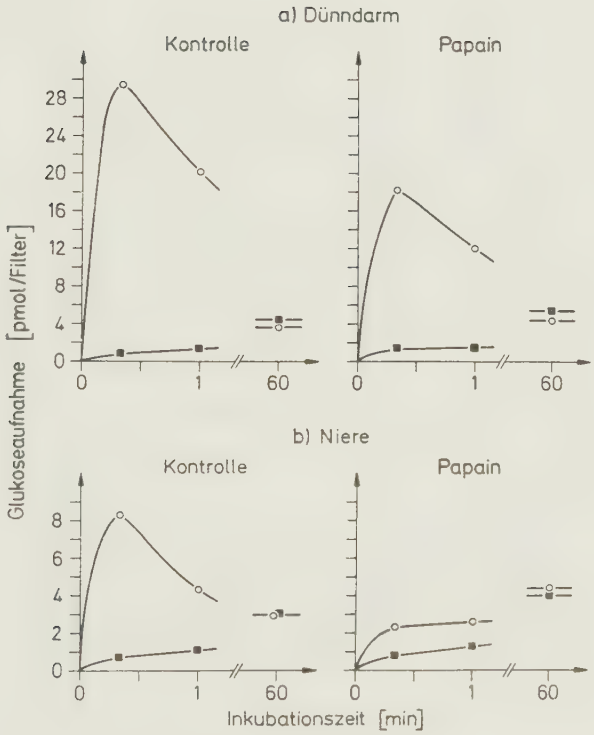

Abb. 10 Na^+- abhängiger D-Glukosetransport durch Papain (1,6 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere. Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —o— bzw.
b) 100 mM KSCN —■—

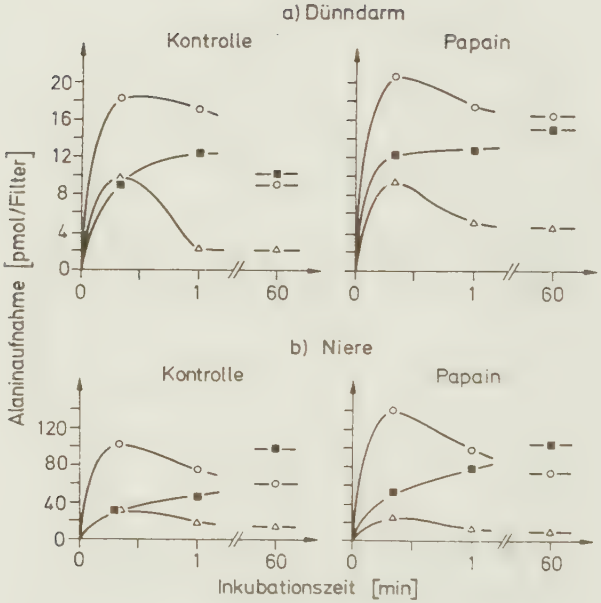

Abb. 11 Na^+- abhängiger L-Alanintransport durch Papain (70 µg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere. Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —○—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,5 mM $HgCl_2$ —△—

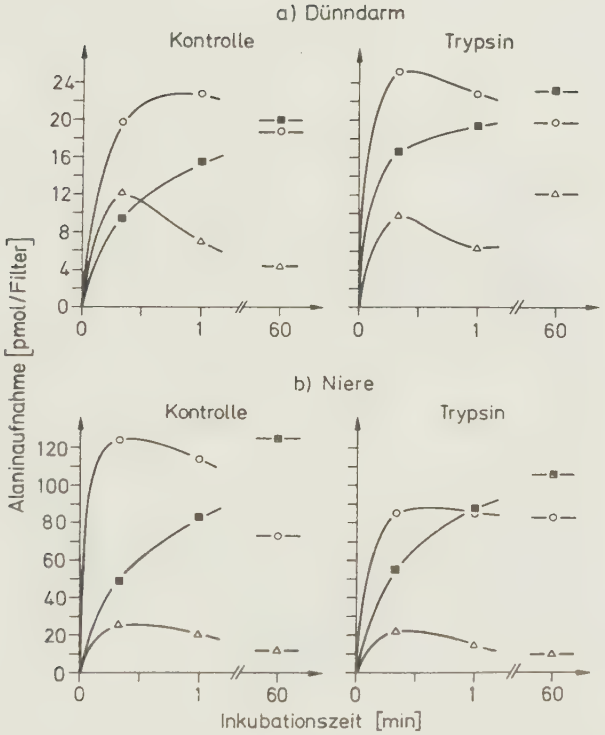

Abb. 12 Na^+- abhängiger L-Alanintransport durch Trypsin (1,4 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere. Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —○—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,5 mM $HgCl_2$ —△—

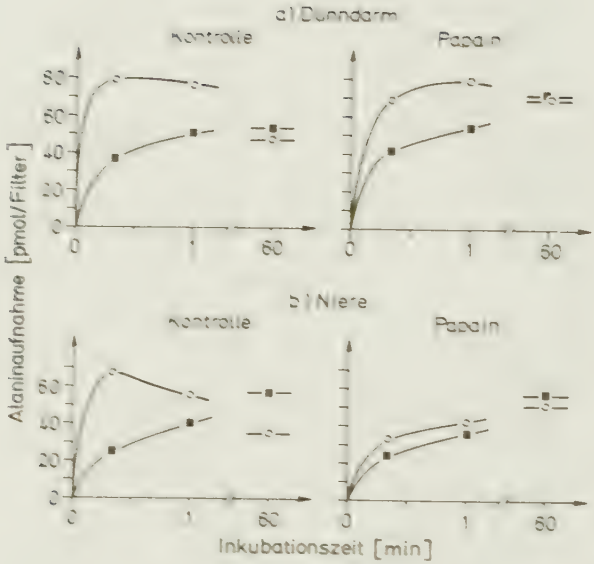

Abb. 13 Na^+- abhängiger L-Alanintransport durch Papain (1,6 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere. Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —o— bzw.
b) 100 mM KSCN —■—

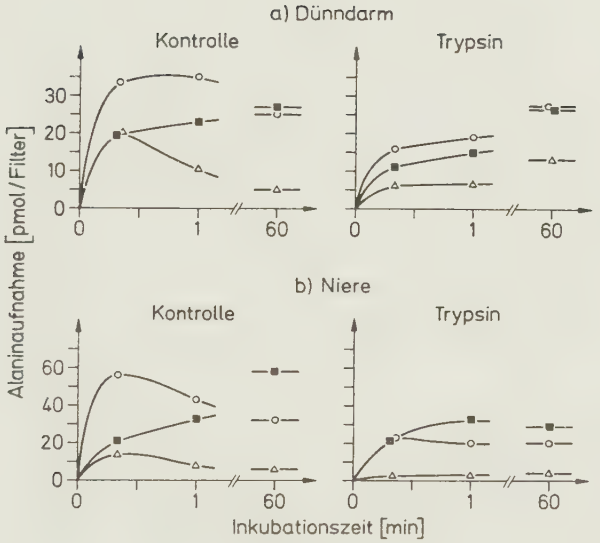

Abb. 14 Na^+- abhängiger L-Alanintransport durch Trypsin (20 mg/ml) behandelte Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere.
Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 1 mM L-Alanin und
a) 100 mM NaSCN —○—
b) 100 mM KSCN —■— bzw.
c) 100 mM NaSCN und 0,5 mM $HgCl_2$ —△—

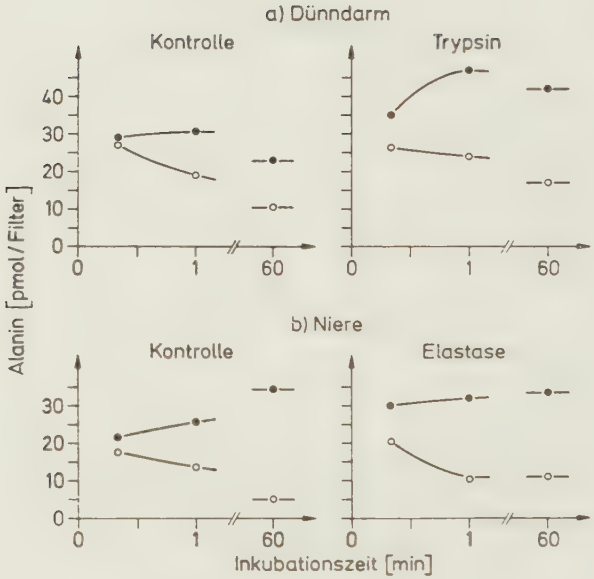

Abb. 15 $HgCl_2$ - Einfluß auf Bürstensaummembranvesikel. Links dargestellt die unbehandelte Kontrollmembran. Die Vesikel wurden 1 Stunde bei 25°C in 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 100 mM NaSCN, 0,1 mM D-Glukose und 1 mM L-Alanin vorinkubiert. Dann wurde
a) Äthanol —■— bzw.
b) in Äthanol gelöstes $HgCl_2$ 0,5 mM —○—
zu den Vesiekln gegeben

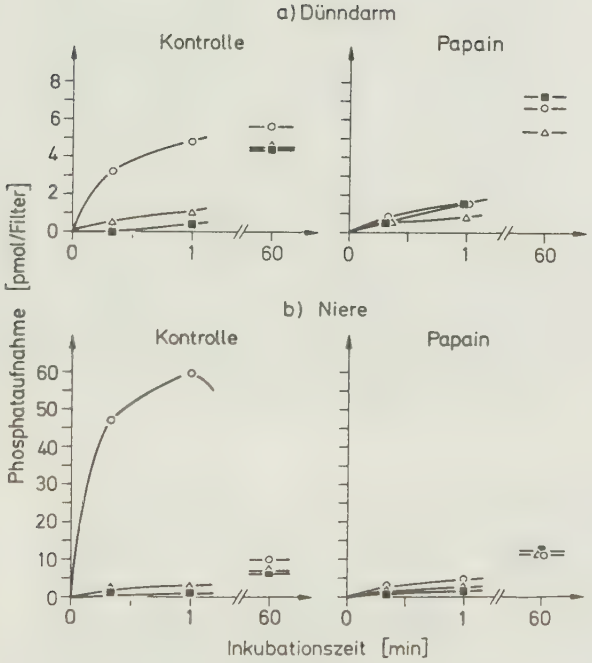

Abb. 16 Na^+- abhängiger Phosphattransport in Bürstensaummembranvesikel von Darm und Niere, die mit Papain (70 ug/ml) behandelt waren.
Links dargestellt die jeweils dazugehörige Kontrollmembran. Das Inkubationsmedium enthielt 100 mM Mannitol, 20 mM Hepes Tris (pH 7,4), 0,1 mM D-Glukose, 0,17 mM Phosphat und
a) 100 mM NaSCN —○— bzw.
b) 100 mM KSCN —■— .
c) Bei —△— enthielt das Inkubationsmedium 100 mM NaSCN und auch die Vesikel enthielten 100 mM NaSCN im Innenraum.

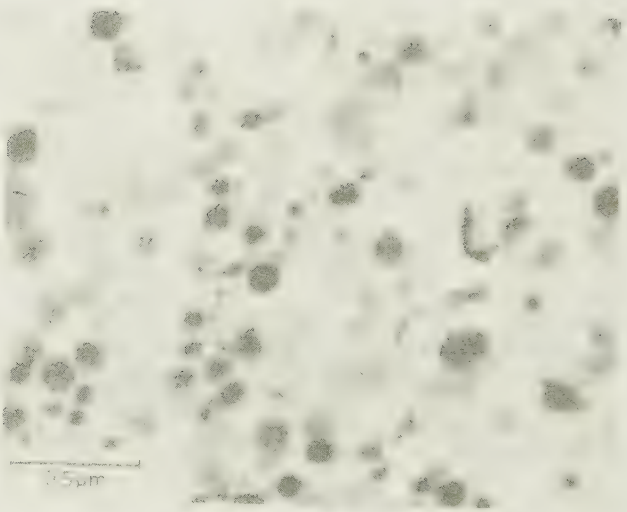

Abb. 17 A Trypsinbehandlung

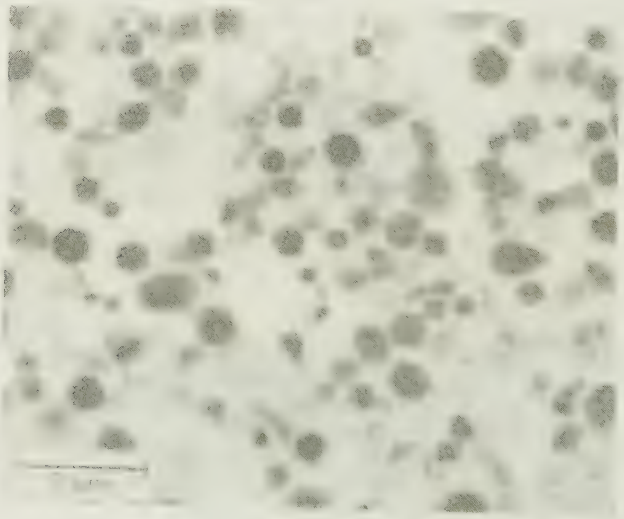

Abb. 17 B Papainbehandlung

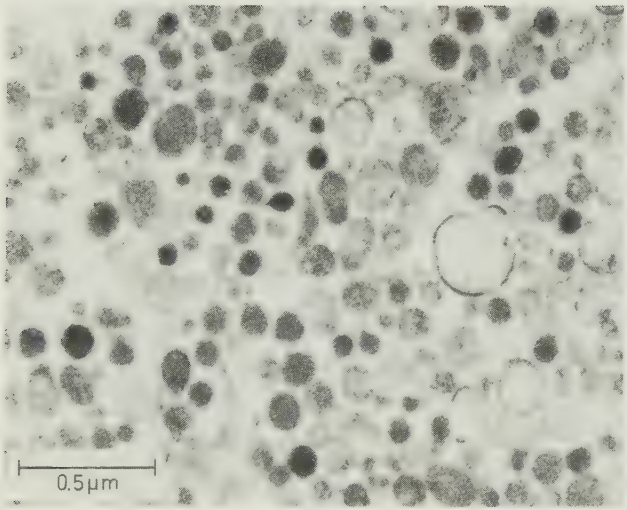

Abb. 17 C Kontrolle

Abb. 17 Dünnschnitte durch Dünndarmbürstensaum-membranvesikel.

A 1 Stunde Trypsinbehandlung (1,4 mg/ml). Man kann evtl. den Eindruck erhalten, daß die Vesikel etwas angeschwollen sind.

B 1 Stunde Papainbehandlung (70 µg/ml). Es ist kein Unterschied zum Kontroll-präparat erkennbar.

C Unbehandelte Kontrollmembranen.

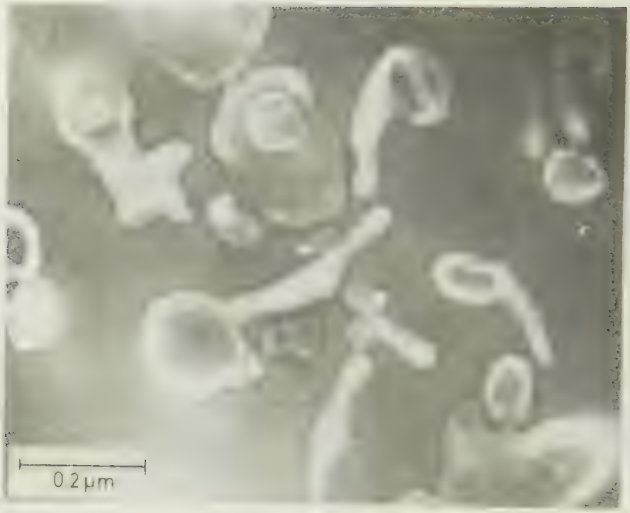

Abb. 18 A Trypsinbehandlung

Abb. 18 B Papainbehandlung

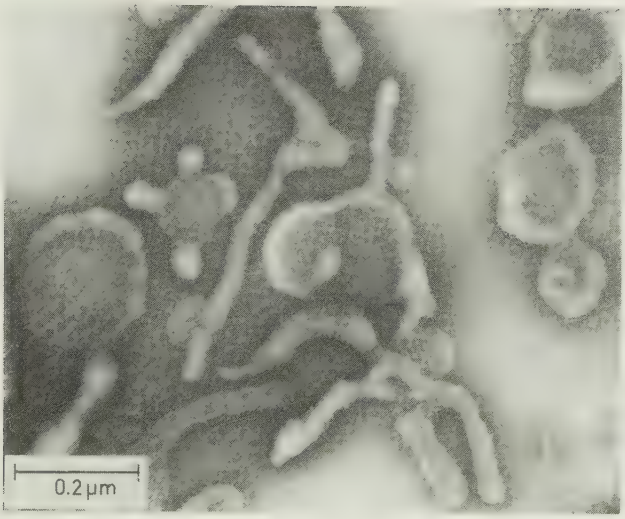

Abb. 18 C Kontrolle

Abb. 18 Negativkontrastierung von Nierenbürstensaum-membranvesikeln.

A 1 Stunde Trypsinbehandlung (1,4 mg/ml). Der Rand der Membranvesikel wird glatter, die Partikel sind vermindert.

B 1 Stunde Papainbehandlung (70 µg/ml). Der Rand der Membranvesikel wird glatter, die Partikel sind vermindert.

C Unbehandelte Kontrollmembranen.

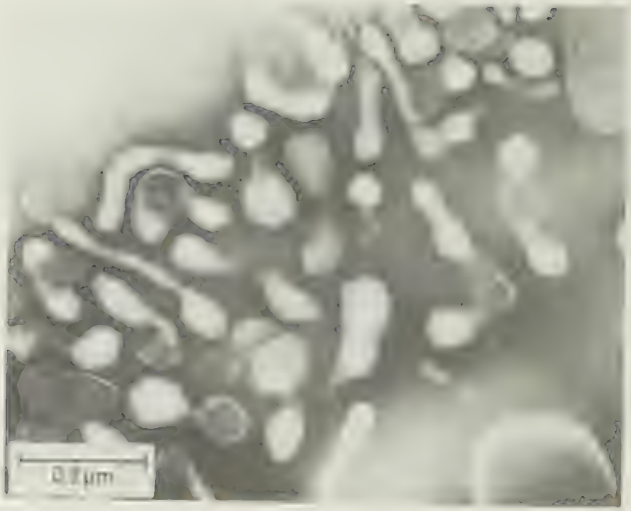

Abb. 19 A Trypsinbehandlung

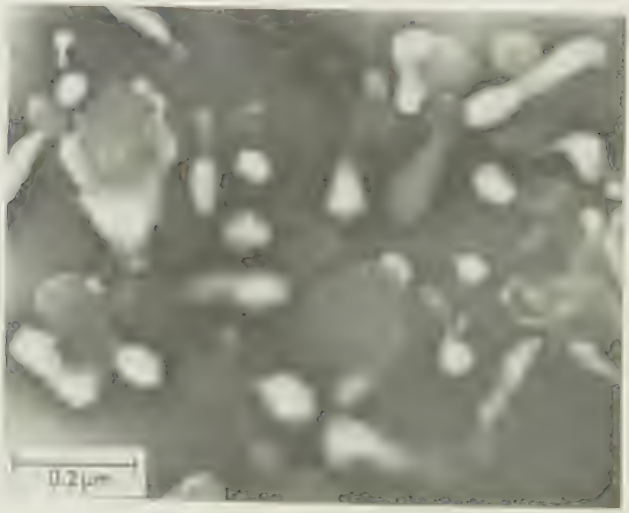

Abb. 19 B Papainbehandlung

Abb. 19 C Kontrolle

Abb. 19 Negativkontrastierung von Dünndarmbürstensaum-membranvesikeln.

A 1 Stunde Trypsinbehandlung (1,4 mg/ml). Partikelminderung ist deutlich vorhanden, jedoch sind noch einzelne Partikel sichtbar.

B 1 Stunde Papainbehandlung (70 µg/ml). Partikelminderung ist stärker als bei Trypsinbehandlung.

C Unbehandelte Kontrollmembranen.

Abb. 20 A Trypsinbehandlung

Abb. 20 B Papainbehandlung

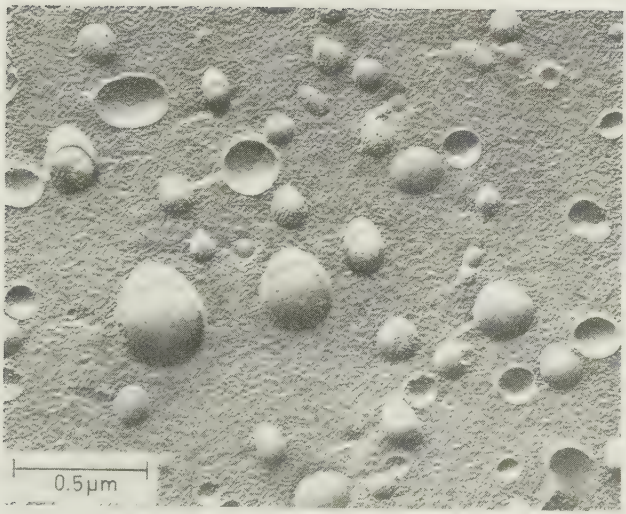

Abb. 20 C Kontrolle

Abb. 20 Gefrierbruch durch Dünndarmbürstensaum-membranvesikel.

A 1 Stunde Papainbehandlung (1,4 mg/ml).

B 1 Stunde Papainbehandlung (70 µg/ml) .

C Unbehandelte Kontrollmembranen.

Eine Beurteilung der Partikelminderung nach Trypsin- und Papainbehandlung ist schwierig, da bereits bei den Kontrollmembranen keine gleichmäßige Verteilung der Partikel auf den Bruchflächen vorhanden ist.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ullrich, K.J., Frömter, E., Murer,H.:
Prinzipien des epithelialen Transportes in Niere und Darm.
Klin. Wochenschrift 57, 977-991 (1979)

2. Frömter,E.:
Solute transport across epithelia: what can we learn from micropuncture studies on kidney tubules?
J. Physiol. (1979), 288,pp.1-31

3. Murer, H.:
Die Rolle der luminalen und kontraluminalen Plasmamembran bei der intestinalen Resorption: Untersuchung der Transporteigenschaften isolierter Membranvesikel;
vorgelegt als Habilitationsschrift an dem Fachbereich Humanmedizin, J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.(1977)

4. Maestracci, D.:
Enzymic solubilization of the human intest. brush border membrane enzymes.
Biochimica et Biophysica Acta, 433 (1976) 469-481

5 Orlowski,M., Meister,A.:
The -Glutamyl Cycle: A Possible Transport System for Amino Acids.
Proceedings of the National Academy of sciences Vol. 67, No 3, pp 1248-1255 Nov. 1970

6. Melani,F. and Gueritore,A.:
Regulation by phosphate of alkaline phosphatase.
Biochem.Biophys.Acta 138; 411-420 (67)

7. Plante,G., Erian,R., Nawar,T. and Peticlerc,C.:
Renal transport of phosphate: role of alkaline phosphatase.
In: Abstracts 7th International Congress of Nephrology, Montreal, June 1978, E-13

8 Stoll,R.:
Der Einfluß der Phosphatdiät auf den natriumabhängigen Phosphattransport in isolierten Vesikeln aus dem Bürstensaum der Rattenniere.
vorgelegt als Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der ges.Med. am Fachbereich Humanmedizin der J.W.Goethe-Universität Frankfurt/M. 1979

9. Evers,C.:
Die Parathormonwirkung auf den Phosphattransport in isolierte Vesikel aus dem Bürstensaum der Rattenniere.
vorgelegt als Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der ges.Med. am Fachbereich Humanmedizin der J.W. Goethe-Universität Frankfurt/M. 1980

10. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent;
J. Biol.Chem. 193, 265 (1951)

11. Laemmli,U.K.:
Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature (London) 227:680, 1970

12. Sacktor,B.:
Trehalase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine.
Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 1007-1014 (1968)

13. Bergmeyer,H.U.:
D-Glukose-Bestimmung mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.
Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, 1970, pp. 1163-1168

14. Hopfer,U., Nelson,K., Perotto,J., Isselbacher,K.J.:
Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine.
J. Biol. Chem. 248, No. 1, 25-32 (1973)

15. Spurr, A.R.:
A low viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43 (1969)

16. Nermut,M.V.:
Methods of negative staining.
In: G. Schimmel, W. Vogell Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stgt. 73

17. Semenza, G.:
Small intestinal disaccharidases: Their properties and role as sugar translocators across natural and artificial membranes.
In: The Enzymes of Biological Membranes. A. Matonosim editor. Vol. 3, p.349. Plenum Press, New York (1976)

18. Lemaire,J., Maestracci,D.:
Labeling of a glucose binding protein in the rabbit intest. brush border membrane.
Can.J.Physiol.Pharmacol. 56:760 (1978)

19. Tilney, L.G. Mooseker, M.:
Actin in the brush border of epithelial cells of the chicken intestine.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68:2611 (1971)

20. Crane, R.K.:
Na^+- dependent transport in the intestine and other animal tissues.
Fed.Proc. 24, 1000-1006 (1965)

21. Noronha-Blob,L.:
Effects of Papain on Enzymic and transport functions of isolated rabbit renal brush border membrane vesicles.
Fed. Proc. 1979 Vol. 38 N3 Biochemistry 3204

22. Tsao, B. and Curthoys,N.P.:
Orientation of brush border membrane activities capable of degrading glutatione.
Biochem. Toronto 1979 05-2-R106

23. Berteloot,A., Bennetts,R.W. and Ramaswamy,K.:
Transport characteristics of Papain-reasted brush border membrane vesicles: Non-involvment of γ-glutamyltransferase in leucine transport.
Fed.Proc.Part. 2 March 1,8 0 Vol. 39 No.3 Art. 4810

Herrn Professor Dr. med. K.-J. Ullrich
danke ich für die Überlassung des Themas.

Gleichfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Murer
für die fachliche Beratung und Unterstützung bei der
Durchführung der Arbeit.
Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. W. Haase für die Hilfe
bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Schnitte,
Herrn Dr. J. Biber für die Hilfe bei der Anfertigung der
Gelelektrophorese, sowie Herrn H. Lesser und Frau I. Haase
bei der Anfertigung der Abbildungen.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Einfluß von Proteasen auf das Transportverhalten von Bürstensaummembranvesikeln des Dünndarmes und des proximalen Tubulus der Niere von Ratten"

im Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K.-J. Ullrich mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. H. Murer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan "Molecular Physiology" unter dem Titel "Effect of Protease Treatment on enzyme content, protein content and transport function of brush border membranes isolated from rat small intestine and kidney cortex " R. Rohn, J. Biber, W. Haase, and H. Murer veröffentlicht.
Ein Abstract erschien in Heft 5, 1979 der Zeitschrift "Nieren- und Hochdruckkrankheiten".

Bad Homburg v.d.H., den 28. Nov. 1982

Rosemarie Rohn

Rosemarie Rohn

Bad Homburg v.d.H.,
Asternweg 8,
den 28. Nov. 1982

LEBENSLAUF

Am 31. August 1955 wurde ich in Bad Homburg v.d.H. als Tochter des kaufmännischen Angestellten Paul Rohn und seiner Ehefrau Ingeborg Rohn, geb. Wilsnack, geboren.

Von April 1962 bis 1966 besuchte ich die Ketteler-Francke-Schule (Volksschule) in Bad Homburg. Anschließend wechselte ich auf die Humboldtschule, Gymnasium in Bad Homburg. Dort bestand ich im Juni 1974 das Abitur.

Im Wintersemester 1974/75 immatrikulierte ich mich im Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und erhielt nach 13 Semestern am 30 April 1981 die Approbation als Ärztin.

Im Mai 1981 begann ich die Facharzt-Ausbildung für Innere Medizin am Akademischen Lehrkrankenhaus Gelnhausen.

Rosemarie Rohn

Rosemarie Rohn

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353